

Poznań, 29 grudnia 2021 roku

Prof. UPP dr hab. Zuzanna Sawinska
Katedra Agronomii
Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Czerwoniec

Pt. „Modyfikacje induktorów odporności roślin do formy jonowej w celu zwiększenia ich aktywności biologicznej”

1. Informacja o rozprawie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Czerwoniec została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. inż. Marcina Śmigłaka. Badania finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu OPUS „Systemiczna odporność nabyta roślin przeciwko wirusom: nowe induktory oraz biologiczna i molekularna charakterystyka mechanizmów ich działania” oraz PRELUDIUM „Badanie wpływu dodatku czynnika antystresowego na obniżenie fitotoksycznego efektu wywołanego poprzez podanie induktora odporności roślinie”.

2. Ocena problematyki badawczej

Rolnictwo w najbliższych latach staje przed wieloma wyzwaniami, wychodząc naprzeciw oczekiwaniom społecznym we wspólnej polityce rolnej. Nowo wprowadzane cele oraz rosnący nacisk i presja ze strony społeczeństwa na ochronę ekosystemów, bioróżnorodności, a także poprawę dobrostanu zwierząt oraz jakości surowca dostarczanego przez rolników, zmusza wszystkich do wprowadzania zmian w swoich systemach produkcji. Jako dwa skrajne i odmienne systemy gospodarowania możemy wyróżnić rolnictwo ekologiczne oraz konwencjonalne. Każdy z systemów gospodarowania realizuje różne cele w różnym ich zakresie. Pierwsze z wymienionych nie dopuszcza stosowania środków ochrony roślin oraz nawozów sztucznych. Znakomicie spełnia cele ochrony ekosystemów i bioróżnorodności. Natomiast rolnictwo konwencjonalne znacznie lepiej spełnia cele ekonomiczne, ponadto przez swoją wydajność efektywniej zaspokaja rynek. Pośrodku skali znajduje się rolnictwo integrowane bądź też precyzyjne, które lepiej niż rolnictwo konwencjonalne spełnia oczekiwania i wymogi dotyczące ochrony środowiska. Oczywiście oraz ponadczasowym wyzwaniem z perspektywy rolnika jest wzrost dochodów, rozwój

gospodarstwa oraz zaspokojenie potrzeb socjalno-bytowych jednak prowadzenie nowoczesnych i zintensyfikowanych upraw wielko powierzchniowych często prowadzi do problemów związanych z ekspozycją roślin na czynniki obniżające plony, zaliczyć do nich możemy min.: choroby grzybowe czy wirusowe, szkodniki, stres abiotyczny wynikający najczęściej z suszy; zbyt niskiego pH, zasolenia czy ograniczonego dostępu do składników pokarmowych. Wyzwania, stojące przed współczesnym rolnictwem, wymagają nowych i bardziej wyrafinowanych metod ochrony roślin. Alternatywą dla fungicydów mogą być min. preparaty indukujące naturalny mechanizm obronny roślin, czyli ich odporność systemiczną (SAR). W ostatnich latach preparaty takie cieszą się coraz większą popularnością właśnie ze względu na rosnącą troskę człowieka o środowisko. Preparaty takie mogą być stosowane we wszystkich fazach rozwoju roślin, chroniąc je przed patogenami z królestw grzybów i bakterii. Podstawą indukowania odporności systemicznej są związki-induktory, które noszą nazwę elicytorów. Induktorami odporności systemicznej roślin są min.: kwas salicylowy (SA), kwas 2,6-dichloroizoniczynowy (INA) i kwas 3-aminomasłowy (GABA). Związki te nie mają negatywnego wpływu na środowisko i nie prowadzą do powstania uodpornionych form patogenów. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) 1107/2009, a także ustawa z 2013 roku o środkach ochrony roślin stanowią o zobowiązaniach krajów członkowskich UE do preferencyjnego traktowania w integrowanej ochronie roślin środków ochrony roślin o charakterze nie chemicznym, ekologicznym i naturalnym. Do takich związków można zaliczyć także induktory odporności roślin. Induktory SAR nie działają bezpośrednio na patogeny, czy szkodniki więc nie przyczyniają się do obniżenia populacji np. owadów pożytecznych czy mikroorganizmów. Aktywacja zjawiska SAR może indukować odporność na szerokie spektrum patogenów, w tym wirusy przeciw którym nie ma żadnych dostępnych skutecznych metod ochrony roślin poza zwalczaniem przenoszących je wektorów. Ponadto do zalet wykorzystania zjawiska SAR zaliczyć można także to że produkty te działają na szerokie spektrum patogenów i mogą być alternatywą dla GMO.

Ciecze jonowe (ILs, ang. Ionic Liquids) to sole organiczne, których temperatura topnienia jest niższa niż temperatura rozkładu i zwykle wynosi mniej niż 100°C lub (w niektórych przypadkach) jest bliska temperaturze pokojowej (RTILs). Składają się one z jonów, gdzie anion może być zarówno organiczny jak i nieorganiczny, natomiast kation ma charakter organiczny i cechuje się niskim stopniem symetrii, co wpływa na tendencję do zmniejszania się energii sieci krystalicznej i w konsekwencji powoduje obniżenie temperatury topnienia związku. Nieustannie rosnące zainteresowanie cieczami jonowymi oraz nieograniczone możliwości kombinacji połączenia kationów i anionów sprawia, że ta grupa

związków wciąż się powiększa. W związku z tym, substancje te podzielono ze względu na typ przeciwjonów. W zależności od rodzaju kationu wchodzącego w skład cząsteczki, można wyróżnić ciecze jonowe amoniowe, fosfoniowe, sulfoniowe, pirydyniowe, imidazoliowe, piperydyniowe i morfoliniowe. Ze względu na swoje unikatowe właściwości fizycznym ciecze jonowe stały się atrakcyjną alternatywą dla rozpuszczalników używanych do syntez chemicznych. Jednak duża grupa cieczy jonowych jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, co niewątpliwie jest atutem z punktu widzenia przemysłu chemicznego, natomiast stwarza to zagrożenie dla ekosystemu wodnego, w którym może dochodzić do akumulacji tych związków, co w konsekwencji może wpłynąć niekorzystnie na organizmy w nich żyjące. Modyfikacja substancji aktywnych środków ochrony roślin do formy jonowej jak wskazuje literatura poprawia ich działanie biologiczne, a co za tym idzie obniża ich efektywną dawkę działania. Ważne zatem jest prowadzenie badań nad cieczami jonowymi, które potencjalnie mogłyby znaleźć zastosowanie w rolnictwie, w celu znalezienia i zdefiniowania zależności między strukturą przeciwjonów wchodzących w skład soli organicznych, a aktywnością biologiczną tych związków.

W świetle przedstawionych powyżej argumentów tematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Czerwoniec jest zatem ważna i aktualna nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z punktu widzenia współczesnego rolnictwa w związku z potrzebą optymalizacji produkcji roślinnej w różnych warunkach przyrodniczych.

3. Struktura pracy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z 263 stron druku. Pracę podzielono na 14 rozdziałów (rozdział 13 nie jest formalnie częścią pracy a opisem dorobku doktorantki) w których sumarycznie znajduje się 67 tabel; 23 ryciny oraz 17 fotografii. Pod tym względem praca zawiera wszelkie elementy, które z formalnego punktu widzenia powinny być uwzględnione w tego typu opracowaniach. Rozprawa składa się z wstępu choć w tym wypadku nazwa ta dotyczy szeroko opracowanego przeglądu literatury, mocno opartego o pozycje książkowe, celu pracy, części doświadczalnej która zawiera opis użytych metod badawczych. Wyniki badań zawarte są w rozdziałach 5-10 w których opisano syntezę, właściwości fizykochemiczne, badanie fitotoksyczności oraz badanie właściwości indukujących naturalną odporność w roślinie otrzymanych w toku badań poszczególnych związków. Każdy z tych 6 rozdziałów wynikowych kończy się podsumowaniem dotyczącym danego związku chemicznego. Rozdział 11 to podsumowanie i wnioski dla całości

przeprowadzonych badań. Praca zawiera także streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis literatury.

Przyjęty układ pracy jest niestety mało przejrzysty najbardziej rzuca się w oczy brak typowej dla tego typu prac dyskusji wyników. Trudno również znaleźć wnioski, jest to bardziej podsumowanie i to z bardzo szerokim opisem, który można było ująć bardziej syntetycznie tak aby czytelnik mógł pozostać z konkretną wiedzą, który związek i z jakich powodów może stać się przydatny w ochronie roślin. Spis treści nieco ułatwia poruszanie się czytelnikowi po zawartości rozprawy doktorskiej, ale i tak przyjęty system opisu, numeracji tabel i rysunków jest dość mocno zagmatwany. Rozdział 13 – wykaz osiągnięć naukowych doktorantki w moim odczuciu nie powinien być częścią pracy a ewentualnie suplementem gdyż praca ta jest rozprawą doktorską a nie spójnym tematycznie cyklem publikacji.

4. Ocena merytoryczna pracy

Tytuł pracy jest czytelny, komunikatywny i adekwatny do jej treści. Całość zredagowana jest starannie i napisana poprawnym językiem.

Doktorantka w swojej rozprawie w części „chemicznej” opisała badania dotyczące syntezy szerokiej grupy nowych związków (ok 190) o potencjalnych właściwościach indukujących systemiczną odporność nabytą w formie soli organicznych (również dwufunkcyjnych soli organicznych) z których wiele może być zakwalifikowanych jako ciecze jonowe. Doktorantka zaprojektowała i przygotowała szeregi soli zawierających anion o właściwościach indukujących naturalną odporność w roślinie oraz kation organiczny. Prekursorami anionów w nowo powstałych solach dwufunkcyjnych były sole potasowe kwasów karboksylowych, mające zdolność wzbudzania indukcji odporności w roślinie, czyli między innymi kwas salicylowy i kwas 2,6-dichloroizoniczynowy oraz ich pochodne, a także sacharyna i kwas 7-karboksybenzo[1,2,3]tiadiazolowy. Jako kationy w nowopowstałych solach użyte zostały często używane w syntezie cieczech jonowych sole pirydyniowe i amoniowe. Szczególnie interesującym, ze względu na swoje działanie antybakteryjne, było użycie jako prekursora kationu chlorku benzetonowego. Wszystkie sole zostały scharakteryzowane przy użyciu analizy spektroskopowej NMR oraz chromatografii jonowej. Następnie Doktorantka oznaczyła rozpuszczalność nowych soli w rozpuszczalnikach organicznych, ich stabilność termiczną, oraz wyznaczyła temperatury przemian fazowych.

Obszerna jest także część pracy dotycząca omówienia badań biologicznych. Przy każdym analizowanym związku wydzielono podrozdziały dotyczące: fitotoksyczności otrzymanych soli oraz badań dotyczących właściwości indukujących naturalną odporność w roślinie danego związku. W przypadku wpływu testowanych związków na kiełkowanie nasion

rzepiku eksperymenty przeprowadzono tylko na związkach, dla których rozpuszczalność w wodzie była dobra lub ograniczona. Badanie właściwości indukujących naturalną odporność w roślinach polegało na spryskaniu liści tytoniu wodnym roztworem badanych soli a po siedmiu dniach zakażeniu roślin wirusem TMV. Roztwory soli nierozpuszczalnych w wodzie zawierały 10% metanolu w celu rozpuszczenia badanych substancji. Następnie po siedmiu dniach dokonano oceny wizualnej za pomocą programu ImageJ, w którym wyznaczono i porównano wielkość obszaru zajętego nekrozami wywołanymi przez zakażenie wirusem z wielkością nekroz, które wystąpiły dla roślin kontrolnych bez takiego zabiegu. W rozdziałach tych interesujący jest opis wpływu otrzymanych związków na fitotoksyczność w stosunku do kiełkujących nasion rzepiki czy roślin tytoniu oraz na poziom indukcji SAR i jego skuteczność w odniesieniu do obiektu kontrolnego na którym nie stosowano tego typu ochrony. Szkoda że nie została w tym względzie przeprowadzona bardziej wnikliwa i dokładniejsza analiza która pomogła by czytelnikowi zrozumieć te zależności. Najbardziej w tej części pracy razi brak konfrontacji uzyskanych wyników z literaturą. A literatury z tego zakresu bynajmniej nie brakuje. Szkoda że przy takiej dużej ilości przeanalizowanej literatury doktorantka nie zdała sobie trudu aby uzyskane wyniki skuteczności skonfrontować z literaturą naukową. Dało by to odpowiedź na wiele pytań które rodzą się w trakcie czytania informacji o uzyskanych w toku przeprowadzonych badań wynikach. Który z przebadanych związków chemicznych daje nadzieje do stosowania jako ochrona przed chorobami powodowanymi przez wirusy, bakterie czy grzyby? Który można by rekomendować do dalszych badań pod kontem stosowania w ochronie upraw rolniczych, sadowniczych czy warzywnych? Te pytania nasuwają się same po przeczytaniu wyników badań oraz po analizie bardzo dobrze opracowanego i przedstawionego w suplementach materiału zdjęciowego. Do tej części mam jeszcze jedno pytanie, dlaczego do badań fitotoksyczności użyto obie badane rośliny czyli rzepik i tytoń a skuteczność oceniano tylko w odniesieniu do tytoniu? Rzepik przecież także jest atakowany przez chorobotwórcze grzyby bakterie czy wirusy.

5. Ocena formalna pracy


Rozprawa jest zredagowana mało przejrzysto co utrudnia czytanie. Jest jednak opracowana starannie i napisana poprawnie językowo. Na podkreślenie zasługuje fakt iż każda z 276 pozycji literatury została przez doktorantkę użyta w pracy. Nie ma literatury która znajduje się w spisie a nie została by zacytowana w tekście. Ponadto wszystkie pozycje mają prawidłowe zapisy co do autorów, czasopism, lat wydania i ilości stron. To świadczy o dużej staranności doktorantki w przygotowaniu tekstu rozprawy doktorskiej. Doktorantka udowodniła także, że potrafi planować

eksperymenty, budować stanowiska badawcze i współpracować ze specjalistami z różnych dziedzin. Informacje na ten temat znajdujemy w rozdziale 13 który sensu stricto nie jest częścią rozprawy, jednak umożliwia zapoznanie się z dorobkiem doktorantki.

Spory niedosyt budzi brak dyskusji wyników z wykorzystaniem szerokiej dostępnej w tym zakresie badań literatury oraz tego elementu dyskusji czy wniosków, który wskazywał by jasno na możliwość wykorzystania konkretnych związków w ochronie roślin. Dlaczego właśnie ten jeden czy być może dwa a może wszystkie uzyskane w toku badań związki nadają się do wykorzystania w ochronie roślin? Jakie cechy chemiczne to warunkują? U których roślin? Czy zdaniem autorki tylko w przypadku tytoniu są takie możliwości? Czy być może istnieje możliwość wykorzystania induktorów odporności o cechach cieczy jonowych także w odniesieniu do innych gatunków roślin. Takie stwierdzenia warto było by zawrzeć w podsumowaniu, wówczas praca miałaby jeszcze większy walor praktyczny. Jest to tym bardziej istotne ze względu na bardzo duże oczekiwania branży agronomicznej w kwestii takich właśnie związków których stosowanie może umożliwić ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin.

6. Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. Nr 65, poz.595 z 16 kwietnia 2003 wraz z późniejszymi zmianami) „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Czerwoniec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. UPP dr hab. Zuzanna Sawinska