



Dr hab. Agnieszka Hanaka, prof. uczelni
Katedra Fizjologii Roślin i Biofizyki
Instytut Nauk Biologicznych
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Lublin, 14.08.2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marii Stasińskiej-Jakubas
pt. „Egzogenna aktywacja szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych oraz modulacja
procesów fizjologicznych u wybranych gatunków roślin leczniczych”
("Exogenous activation of secondary metabolite biosynthesis pathways and modulation
of physiological processes in selected medicinal plant species")**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana została pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Barbary Hawrylak-Nowak, prof. uczelni w Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin, na Wydziale Biologii Środowiskowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz Pana promotora pomocniczego prof. dr. hab. Sławomira Dreslera.

Przygotowana przez Panią mgr inż. Marię Stasińską-Jakubas rozprawa doktorska dotyczy egzogennej aktywacji biosyntezy wybranych metabolitów wtórnych oraz zmian procesów fizjologicznych u trzech istotnych gospodarczo gatunków roślin leczniczych. Wybranymi do badań gatunkami roślin były *Melissa officinalis* L. (melisa lekarska), *Hypericum perforatum* L. (dziurawiec zwyczajny) i *Chelidonium majus* L. (glistnik jaskółcze ziele). Podjęty temat jest istotny dla rolnictwa i przemysłu zielarskiego, gdyż dzięki doborowi właściwych elicytorów w odpowiednich stężeniach, drogi i czasu ich aplikacji, daje perspektywy na optymalizację produkcji roślinnej i kontrolowaną intensyfikację syntezy istotnych dla człowieka związków aktywnych biologicznie w warunkach polowych.





Celem badań Pani mgr inż. Marii Stasińskiej-Jakubas była ocena wpływu trzech wybranych elicytorów chemicznych, tj. mleczanu chitozanu, seleninu sodu i kwasu salicylowego (odpowiednio ChL, Se i SA) na akumulację wybranych metabolitów wtórnych, poziom stresu oksydacyjnego oraz zmiany fizjologiczne i biometryczne u *M. officinalis*, *H. perforatum* oraz *C. majus*. Realizacja tego celu możliwa była dzięki wyznaczeniu stężeń elicytorów optymalnych dla indukcji metabolitów wtórnych, określeniu zmian zawartości metabolitów w czasie oraz ocenie zależności między zawartością metabolitów wtórnych, poziomem stresu oksydacyjnego i zmianami fizjologicznymi.

Ocena formalna rozprawy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczny układ i zawiera kolejno następujące części: streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie teoretyczne, hipotezę i cel badań, materiały i metody, omówienie wyników, dyskusję, wnioski, bibliografię, kopie opublikowanych prac, oświadczenia doktoranta oraz współautorów i zyciorys naukowy. Dezyderat został napisany w języku polskim, natomiast opublikowane prace zostały napisane w języku angielskim. Dezyderat liczy 157 numerowanych stron, łącznie z kopiami prac opublikowanych w latach 2022-2024 i jednej pracy pozostającej w trakcie procesu redakcyjnego (już po złożeniu rozprawy, a dokładnie w dniu 27.06.2025 r. publikacja ta została opublikowana). Rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem naukowym. Założenia pracy są właściwe, a przyjęta metodologia prawidłowa.

We Wprowadzeniu teoretycznym liczącym 11 stron Doktorantka dokonała krótkiej charakterystyki zastosowanych w badaniach elicytorów: biotycznego (chitozanu) oraz abiotycznych (kwasu salicylowego i seleninu). Opisała również badane gatunki roślin leczniczych, melisę lekarską, dziurawiec zwyczajny i glistnik jaskółcze ziele, zwracając uwagę na zawartość metabolitów wtórnych pożądaných przez człowieka.

Doktorantka zwięźle przedstawiła hipotezę badawczą oraz cel badań podając trzy cele szczegółowe.





Materiały i metody zostały zaprezentowane na 10 stronach i zawierają opis przygotowania roztworów elicytorów oraz oddzielnie dla każdego gatunku szczegóły dotyczące uprawy roślin i zastosowane układy eksperymentalne. Zaprezentowano tabelaryczne zestawienie sposobów przygotowania ekstraktów roślinnych do analiz laboratoryjnych (Tabela 1) oraz kolejno opisy oznaczenia: zawartości wybranych metabolitów wtórnych (w tym analizę jakościową i ilościową), parametrów statusu oksydacyjnego roślin (włączając aktywność enzymów antyoksydacyjnych i test DPPH) oraz parametrów biometrycznych (masa pędów) i fizjologicznych (np. zawartość barwników fotosyntetycznych i parametrów fluorescencji chlorofilu). Dokonano też opisu przeprowadzonych analiz statystycznych (przy użyciu programu Statistica). Dane otrzymane z melisy lekarskiej i dziurawca zwyczajnego poddano dwuczynnikowej analizie wariancji, a z glistnika jaskółczego ziela – jednoczynnikowej analizie wariancji.

W 16-stronnicowym Omówieniu wyników wyróżniono cztery części przedstawiając kolejno: (1) tabelaryczne zestawienie metabolitów wtórnych zidentyfikowanych w analizowanych gatunkach roślin leczniczych (Tabela 2), (2) zmiany zawartości metabolitów wtórnych pod wpływem elicytorów (załączając dla każdej rośliny po jednej kluczowej rycinie i jednej tabeli wraz z wynikami analiz statystycznych), (3) wpływ elicytorów na status oksydoredukcyjny i (4) na procesy fizjologiczne roślin leczniczych.

Dyskusja zajęła 8 stron, a Wnioski – 2 strony. Bibliografia obejmuje 107 pozycji literatury.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w czterech artykułach naukowych w języku angielskim. Jedną z prac to praca przeglądowa opublikowana w *Molecules* w 2022 r. (P1; IF 4,6; MNiSW 140 pkt). Dwie prace eksperymentalne zostały opublikowane w *Industrial Crops and Products* w 2023 r. (P2; IF 5,9; MNiSW 200 pkt) i w *Phytochemistry* w 2024 r. (P3; IF 3,2; MNiSW 100 pkt). Czwarta praca została wysłana do czasopisma *Molecules* i w czasie składania rozprawy była po pierwszych recenzjach,





natomiast w dniu 27.06.2025 r. została opublikowana (P4; IF 4,2; MNiSW 140 pkt). Łączna punktacja opublikowanych prac wynosi 440 pkt. MNiSW i 13,7 IF.

W każdej z czterech prac Doktorantka jest pierwszym autorem, co potwierdza Jej wiodącą rolę w powstaniu tych publikacji. Praca P1 ma dwie współautorki, prace P2 i P3 liczą pięciu współautorów, a praca P4 przed przyjęciem do opublikowania miała 5, a po opublikowaniu ma 6 współautorów. Liczba współautorów wskazuje, że Doktorantka miała okazję pracować w większości przypadków w kilkusobowych zespołach i rozwijać umiejętność podziału obowiązków i efektywnej komunikacji w grupie.

W załączonych oświadczeniach o współautorstwie, jak również w każdej z czterech publikacji umieszczono indywidualny wkład Doktorantki w powstanie prac. Jasno wynika z nich, że Pani mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas współtworzyła koncepcje prac, brała udział w przeprowadzeniu doświadczeń wegetacyjnych i analiz laboratoryjnych, wizualizacji danych, analiz statystycznych i interpretacji wyników oraz opracowaniu pierwszej wersji manuskryptu. Na tej podstawie można stwierdzić, że posiada umiejętność prowadzenia pracy naukowej na każdym jej etapie, więc jest dobrze przygotowana do bardziej samodzielnych wyzwań naukowych.

Poza publikacjami składającymi się na rozprawę doktorską Pani mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas jest również współautorką dwóch publikacji opublikowanych w 2021 i 2023 r., odpowiednio w International Journal of Molecular Sciences i Molecules. Wszystkie publikacje (w sumie jest ich 6) są indeksowane w bazie Scopus, mają już łącznie 139 cytowań (włączając autocytowania), co dobrze rokuje dla ich dalszego rozpowszechniania i cytowania w naukowej literaturze światowej, a indeks Hirscha wynosi 5.

Pani mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas podczas kształcenia w szkole doktorskiej odbyła dwa staże naukowe, w 2023 r. w ośrodku zagranicznym (Węgry – 6 tygodni) i w 2025 r. w ośrodku krajowym (2 tygodnie). Ponadto Doktorantka wykazała się mobilnością zagraniczną w ramach programu Erasmus+ spędzając po 5 dni w uniwersytetach we Włoszech, w Czechach i w Turcji. W 2024 r. Doktorantka otrzymała dwa wyróżnienia za





wystąpienia ustne na konferencjach odbywających się w Polsce, tj. International PhD Student's Conference w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie oraz XXIX Conference „New Aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives” w Olsztynie. Ponadto wygłosiła cztery inne referaty na konferencjach krajowych, dwa w 2022 r. i dwa w 2023 r. W latach 2022, 2023 i 2025 zaprezentowała trzy postery na konferencjach międzynarodowych, a w 2025 r. dodatkowo dwa postery na konferencjach krajowych. Prowadziła również aktywność popularyzatorską włączając się we współprowadzenie cyklicznych imprez, tj. warsztatów laboratoryjnych w ramach trzech edycji Lubelskiego Festiwalu Nauki w latach 2022-2024 (pomyłka na str. 155 – XVIII edycja odbyła się w roku 2022, nie 2023) oraz Nocy Biologów w 2025 r. Prowadziła również trzykrotnie warsztaty dla uczniów liceów (rocznie w latach 2023-2025).

Doktorantka wykazywała się aktywnością organizacyjną. Była czterokrotnie członkiem komitetów organizacyjnych konferencji, w tym trzech międzynarodowych (International PhD Student's Conference ENVIRONMENT-PLANT-ANIMAL-PRODUCT w latach 2023-2025) i jednej krajowej (Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne”). Była też członkiem Rady Samorządu Doktorantów UP w Lublinie (rok akademicki 2023/2024 i 2024/2025) oraz przedstawicielem doktorantów w Komisji Dyscyplinarnej dla Doktorantów (rok akademicki 2024/2025). Od 2024 r. jest członkiem nadzwyczajnym Polskiego Towarzystwa Chitynowego.

Ocena merytoryczna rozprawy

Pani mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas dokonała właściwego wprowadzenia teoretycznego i syntetycznie zaprezentowała materiał roślinny i stosowane metody. W części Materiały i metody (str. 20-22) można było pokusić się o przedstawienie schematu klarownie przedstawiającego stałe i zmienne elementy układu eksperymentalnego ułatwiające śledzenie modyfikacji (komentuję w dalszej części recenzji). Z drugiej strony, warte docenienia jest wprowadzanie zmian dotyczących kombinacji doświadczalnych czy punktów czasowych





pomiarów w kolejnych publikacjach, co świadczy o dokonywaniu skrupulatnych bieżących analiz i wyciąganiu wniosków z uzyskanych wyników.

Doktorantka osiągnęła cel główny badań, tj. poddała ocenie wpływ wybranych substancji należących do elicytorów na akumulację metabolitów wtórnych o potencjale terapeutycznym, charakterystycznych dla trzech gatunków roślin. Zrealizowała również trzy cele szczegółowe: dokonała optymalizacji stężeń elicytorów i w publikacjach składających się na rozprawę doktorską używała już wyłącznie efektywnie działających stężeń, określiła zmiany poziomu metabolitów w kilku punktach czasowych do 10 dnia elicytacji wyłącznie oraz powiązała poziom akumulacji tych metabolitów ze statusem oksydacyjnym i zmianami fizjologicznymi.

Doktorantka rzeczowo omówiła wyniki i opatrzyła je analizą statystyczną z wykorzystaniem oprogramowania Statistica, co dowodzi Jej należytych kompetencji w tym zakresie. Wykazała się umiejętnością prowadzenia merytorycznej dyskusji popartej danymi literaturowymi. Na str. 49 wyjaśniła powód rezygnacji z aplikacji mieszaniny ChL + Se +SA w publikacji P4. Wnioski zawarła w 13 całkiem klarownie skonstruowanych podpunktach. We wniosku nr 3 (str. 54) dobrze byłoby doprecyzować informację. W przypadku dziurawca badania były prowadzone od 5. dnia więc uogólnienie o tendencji obserwowanej do 4. dnia nie jest zasadne. Przegląd literatury został wnikliwie przeprowadzony i obejmuje najnowsze artykuły. Artykuły te są cytowane zarówno we wstępnych rozdziałach dezyderatu wprowadzających w poruszane zagadnienia i podjętą tematykę badań, jak i w poszczególnych publikacjach składających się na rozprawę doktorską.

Wysoka jakość przedłożonej rozprawy doktorskiej jest niepodważalna, gdyż wchodzące w jej skład publikacje zostały opublikowane w recenzowanych i wysoko punktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Przedłożę zatem komentarz dotyczący tych artykułów.





Praca przeglądowa (P1) dotycząca chitozanu stanowi właściwe wprowadzenie w tematykę zastosowania tego elicytora. Na 17 stronach dokonano opisu aktywności biologicznej chitozanu, omówiono jego kilkukierunkowe zastosowanie, tj. jako biostymulanta w uprawach roślin, czynnika ochronnego i istotnego dla przechowalnictwa roślin oraz elicytora biotycznego. W publikacji zamieszczono dwie ryciny i jedną tabelę, które stanowią cenne uzupełnienie omawianych treści. Na Rycinie 1 schematycznie zobrazowano biologiczne i chemiczne metody ekstrakcji chityny oraz kierunki przemysłowego zastosowania chitozanu i jego pochodnych. Na Rycinie 2 skupiono się na przedstawieniu zastosowania chitozanu i jego pochodnych w produkcji roślinnej. Na podstawie 17 artykułów stworzono wartościową merytorycznie tabelę, w której zamieszczono wpływ chitozanu, jego formy, dawki i metody podania na produkcję metabolitów wtórnych w różnych gatunkach roślin. Praca powstała na bazie solidnego przeglądu 119 pozycji literatury, łącznie z cytowaniem najnowszych artykułów z roku publikacji pracy P1, czyli z roku 2022. Co ważne, w oparciu o bazę Scopus łączna liczba cytowań osiągnięta od daty publikacji, czyli od dnia 28.04.2022 r. wynosi aż 90. To potwierdza jakość publikacji i wagę prezentowanych w niej treści dla nauki.

W pracy P1 dokładnie omówiono jeden z trzech aplikowanych elicytorów. Dla poszerzenia wiedzy na temat pozostałych dwóch elicytorów, na podstawie przeglądu literatury, poproszę o podanie przykładów akumulacji metabolitów wtórnych o (potencjalnych) właściwościach leczniczych pod wpływem egzogennej aplikacji selenu i kwasu salicylowego (dawka, sposób aplikacji).

Każda z trzech prac eksperymentalnych (P2-P4) jest bardzo rozbudowana metodycznie i wynikowo. Oznacza to, że badania wymagały dużego nakładu pracy i dobrej organizacji działań już na etapie uprawy roślin, a następnie na etapie analiz laboratoryjnych. Przygotowywanie próbek do badań i wykonywanie pomiarów pozwoliło Doktorantce na zapoznanie się ze zróżnicowanymi metodologicznie procedurami oraz na nabycie pokaźnego



warsztatu laboratoryjnego. Prace P2 i P3 obejmowały 5 kombinacji doświadczalnych i 4 punkty czasowe (wraz z powtórzeniami), natomiast praca P4 – 4 kombinacje doświadczalne i 3 punkty czasowe (z powtórzeniami).

Praca eksperymentalna P2 dotyczy aplikacji trzech różnych chemicznie substancji (100 mg/L mleczanu chitozanu, 10 mg/L seleninu sodu i 150 mg/L kwasu salicylowego oraz mieszaniny tych trzech substancji w proporcji 1:1:1) w celu oceny efektywności dolistnego podawania tych związków w indukcji odpowiedzi biologicznej i produkcji metabolitów wtórnych u melisy rosnącej w doniczkach na podłożu uniwersalnym. Liście pozyskiwano w 4., 6., 8. i 10. dniu elicytacji. Zastosowano zróżnicowane metody badawcze, które pozwoliły na oznaczenie (I) zawartości metabolitów wtórnych, (II) statusu antyoksydacyjnego oraz (III) wzrostu roślin i wybranych parametrów fizjologicznych. Całkowita zawartość związków fenolowych i flawonoli była oznaczona spektrofotometrycznie (Ryc. 1), natomiast ośmiu konkretnych kwasów fenolowych i ich pochodnych – przy użyciu ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) sprzężonej ze spektrometrią mas (MS) (Ryc. 2, 3). W celu oznaczenia statusu antyoksydacyjnego spektrofotometrycznie zmierzono poziom peroksydacji lipidów (reakcja z kwasem tiobarbiturowym) i nadtlenu wodoru, aktywność dwóch enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i peroksydazy askorbinianowa oraz wykazano brak aktywności peroksydazy gwajakolowej) (Ryc. 6) i aktywność antyoksydacyjną w teście DPPH (Ryc. 7). Ponadto histochemicznie zwizualizowano obecność dwóch reaktywnych form tlenu (Supl. Ryc. 1, 2). Oznaczono suchą masę pędów, zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofile *a* i *b* oraz karotenoidy) (Ryc. 8), a także zmierzono trzy parametry fluorescencji chlorofilu (fluorescencję minimalną, maksymalną i stosunek fluorescencji zmiennej do maksymalnej) (Ryc. 9). Dla związków fenolowych wykonano mapę cieplną i analizę głównych składowych (PCA). Finalnie, na 13 stronach pracy P2 przedstawiono 9 rycin, a w suplemencie załączono kolejne 3 ryciny i jedną tabelę. Zacytowano 64 pozycje literatury.



Kluczowe osiągnięcia tej pracy są następujące:

- Wykazano obecność ośmiu kwasów fenolowych i ich pochodnych w liściach melisy.
- Dolistna aplikacja pojedynczych elicytorów, tj. ChL i SA była najbardziej efektywna w akumulacji związków fenolowych, a mieszanina trzech związków generalnie nie zmieniała ich zawartości.
- Efektywność akumulacji była największa w 8. dniu elicytacji przy braku zmian w 4. dniu elicytacji.
- Najwyższe stężenie uzyskał heksozyd kwasu rozmarynowego, a istotnie wysokie – 2 kwasy, rozmarynowy i litospermowy.
- Zmiany w poziomie metabolitów wtórnych są częściowo skorelowane ze wzrostem poziomu peroksydacji lipidów i akumulacją nadtlenu wodoru, co może świadczyć o udziale ROS w indukcji metabolitów roślinnych.
- Aplikacji ChL i SA towarzyszyło obniżenie stężenia chlorofilu *b* i puli karotenoidów.

Pojawiły się jednak pewne niejasności.

- 1) Na str. 21 pracy widnieje informacja, że w 4., 6., 8. i 10. dniu elicytacji przeprowadzano wszystkie analizy, natomiast w pracy P2 na Rycinie 6 (poziom peroksydacji lipidów i nadtlenu wodoru, aktywność enzymów antyoksydacyjnych) przedstawione są wyniki pochodzące z jednego punktu czasowego, zapewne z 10 dnia elicytacji, czy tak? Czy zatem prowadzono te badania również w innych punktach czasowych? Jeśli tak, to co wynikało z tych badań? Poproszę o uściślenie. Czy biomasę i poziom barwników fotosyntetycznych mierzono wyłącznie w 10. dniu?
- 2) Dlaczego badania parametrów fluorescencji przedstawione w P2 na Rycinie 9 wykonano w 3. i 10. dniu? Czy wykonywano te badania również w innych punktach czasowych?

Praca eksperymentalna P3 zawiera podobny zestaw analiz do tego opisanego w pracy P2. Dotyczy aplikacji 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se i 150 mg/L SA oraz mieszaniny tych trzech





substancji w proporcji 1:1:1 (analogicznie, jak w publikacji P2) w celu oceny efektywności dolistnego podawania tych związków w indukcji odpowiedzi i produkcji metabolitów wtórnych u dziurawca rosnącego w doniczkach w mieszaninie ziemi uniwersalnej i piasku (3:1). Liście pozyskiwano w 5., 8. i 10. dniu elicytacji. Zastosowano metody badawcze, w większości takie same, jak opisane w pracy P2. Pozwoliły one na oznaczenie (I) poziomu metabolitów wtórnych, (II) statusu antyoksydacyjnego oraz (III) wzrostu roślin i parametrów fizjologicznych. Całkowita zawartość związków fenolowych i flawonoli była oznaczona spektrofotometrycznie (Ryc. 1), natomiast 11 poszczególnych metabolitów wtórnych należących m.in. do flawonoidów – przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) (Ryc. 2-4). Status antyoksydacyjny mierzono spektrofotometrycznie oznaczając aktywność trzech enzymów antyoksydacyjnych (katalazy oraz peroksydaz askorbinianowej i gwajakolowej) (Ryc. 5) i aktywność antyoksydacyjną w teście DPPH (Supl. Ryc. 1). Ponadto histochemicznie zwizualizowano obecność dwóch reaktywnych form tlenu (Ryc. 6). Oznaczono świeżą masę pędów, zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofilu i karotenoidów) (Ryc. 7), zmierzono trzy parametry fluorescencji chlorofilu (Supl. Ryc. 2) oraz stężenie proliny (Ryc. 8). Praca P3 liczy 11 stron i zawiera 8 rycin, natomiast w suplemencie uwzględniono kolejne dwie ryciny. Zacytowano 61 pozycji literatury.

Istotne osiągnięcia tej pracy są następujące:

- Wykazano obecność 11 metabolitów wtórnych, w tym siedmiu należących do grupy flawonoidów i ich pochodnych (dwie pochodne kwercetyny nie zostały zidentyfikowane), jednego – należącego do kwasów fenolowych, dwóch – z grupy naftodiantronów i jednego – z grupy floroglucynoli.
- Dolistna aplikacja pojedynczych elicytorów, tj. Se i SA była najbardziej efektywna w akumulacji flawonoidów, czemu towarzyszyła redukcja poziomu naftodiantronów.
- Najwyższy wzrost zaobserwowano w stężeniu kwasu neochlorogenowego w 5. dniu aplikacji Se.





- Efektywność akumulacji flawonoidów (epikatechina, hiperozyd, rutozyd i kwercetyna) była największa w 10 dniu elicytacji, co może mieć związek ze zmianami w poziomie ROS i aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz ze wzrostem stężenia proliny.
- Aplikacji Se towarzyszyło obniżenie stężenia chlorofilu *b* i puli karotenoidów.

Proszę o wyjaśnienie kilku nieścisłości.

- 1) Na str. 25 podano, że w publikacji P3 dokonano oznaczenia stężenia nadtlenu wodoru, pomimo, że w publikacji P3 nie ma mowy o tym oznaczeniu.
- 2) Dlaczego w publikacji P3 zastosowano pomiar w 5 dniu elicytacji, zamiast w dwóch odrębnych terminach, 4 i 6, jak w publikacji P2?

Praca eksperymentalna P4 zawiera podobny zestaw analiz do tego opisanego w pracach P2 i P3. Praca dotyczy aplikacji 100 mg/L ChL, 10 mg/L Se i 150 mg/L SA ale bez zastosowania mieszaniny tych trzech substancji (odmiennie jak w publikacjach P2 i P3) w celu oceny efektywności dogłębowego podawania tych związków w indukcji odpowiedzi i produkcji metabolitów wtórnych u glistnika rosnącego w doniczkach na podłożu uniwersalnym. Ziele pozyskiwano w 4., 7. i 10. dniu elicytacji. Zastosowano metody badawcze, które pozwalające na oznaczenie (I) poziomu metabolitów wtórnych, (II) statusu antyoksydacyjnego oraz (III) wzrostu roślin i parametrów fizjologicznych. Całkowita zawartość związków fenolowych i flawonoli była oznaczona spektrofotometrycznie (Ryc. 2), natomiast sześciu konkretnych alkaloidów izochinolinowych – przy użyciu HPLC (Ryc. 1). Status antyoksydacyjny mierzono spektrofotometrycznie oznaczając aktywność trzech enzymów antyoksydacyjnych (katalazy i peroksydazy gwajakolowej oraz wykazując brak aktywności peroksydazy askorbinianowej) (Ryc. 3), poziom nadtlenu wodoru i peroksydacji lipidów (Ryc. 4) i aktywność antyoksydacyjną w teście DPPH (Ryc. 5). Ponadto histochemicznie zwizualizowano obecność dwóch reaktywnych form tlenu (Ryc. 6). Oznaczono świeżą masę pędów (Supl. Ryc. 2), zawartość barwników fotosyntetycznych (chlorofile i karotenoidy) (Supl. Ryc. 4), zmierzono trzy parametry fluorescencji chlorofilu





(Supl. Ryc. 3) oraz stężenie proliny (Ryc. 6). Praca P4 zawiera 6 rycin, a do suplementu dołączono kolejne 4 ryciny. Zacytowano 48 pozycji literatury.

Najistotniejsze osiągnięcia tej pracy są następujące:

- Wykazano obecność sześciu alkaloidów izochinolinowych w ziele glistnika.
- Doglebowa aplikacja Se i SA była najbardziej efektywna w akumulacji protopiny, berberyny i allokryptopiny.
- Najwięcej zmian metabolicznych stwierdzono w 7. i 10. dniu elicytacji.
- Zmiany w poziomie metabolitów wtórnych są częściowo skorelowane ze zmianami poziomu peroksydacji lipidów i akumulacji nadtlenu wodoru, co może świadczyć o udziale ROS w indukcji metabolitów roślinnych.
- W 10. dniu aplikacji Se wykazano obniżenie stężenia chlorofilu *b*.

Przedkładałam do uściślenia:

Dlaczego w przypadku enzymów, nadtlenu wodoru, peroksydacji lipidów, dokonywano pomiarów w dniach 2 i 10, a w przypadku fluorescencji chlorofilu i barwników fotosyntetycznych w dniach 4 i 10?

Podsumowanie prac eksperymentalnych (P2-P4)

Wyniki zaprezentowane w trzech publikacjach eksperymentalnych potwierdziły brak wpływu zastosowanych związków na biomasę roślin. Co istotne, nie stwierdzono objawów fitotoksyczności. Na podstawie przedłożonych badań można wyciągnąć kluczowy wniosek, że zastosowane elicytory mają potencjał aplikacyjny.

Generalnie, w tematyce elicytacji brakuje tak kompleksowo prowadzonych badań, jak przedstawiła Doktorantka. Unikalnym wkładem do nauki jest:

- porównanie efektów działania substancji należących do trzech różnych grup elicytorów chemicznych, tj. mleczanu chitozanu, seleninu sodu i kwasu salicylowego w ramach tego samego gatunku rośliny leczniczej;





- prowadzenie elicytacji przez 4/5 do 10 dni z 3/4 punktami czasowymi dla danego gatunku rośliny;
- powiązanie czasu trwania elicytacji z jej efektami metabolicznymi, antyoksydacyjnymi i fizjologicznymi w trzech różnych gatunkach roślin leczniczych w warunkach *in vivo*;
- powiązanie poziomu akumulacji wybranych metabolitów wtórnych, charakterystycznych dla danej rośliny leczniczej z poziomem stresu oksydacyjnego oraz ze zmianami fizjologicznymi i biometrycznymi u *M. officinalis*, *H. perforatum* oraz *C. majus*.

Inne uwagi

Rozprawa jest estetycznie przygotowana. Błędy edytorskie, interpunkcyjne czy stylistyczne są rzadkie, np. str. 11 – glukonoza czy glukonaza?, str. 57 – pozycje 21 i 22: powinno być „Hagège”, Abstract P4: „150 mg/L mleczanu chitozanu, ... i 100 mg/L kwasu salicylowego” vs. Materials and methods P4 i str. 22: „100 mg/L mleczanu chitozanu, ... i 150 mg/L kwasu salicylowego”.

Podsumowanie

Pomimo zgłoszonych uwag i komentarzy, jednoznacznie wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy. Przedstawiona dysertacja nawiązuje do aktualnego stanu wiedzy związanego z optymalizacją produkcji roślinnej oraz wnosi nowe informacje o elicytacji i potencjale aplikacyjnym wybranych elicytorów do syntezy związków aktywnych biologicznie w roślinach o działaniu terapeutycznym. W efekcie przeprowadzonych badań Doktorantka osiągnęła cele rozprawy i wykazała się umiejętnością posługiwania się zróżnicowaną metodyką badawczą. Prawidłowo przeprowadziła wizualizację uzyskanych danych i analizę zgromadzonego materiału badawczego, rzeczowo przedyskutowała wyniki oraz właściwie sformułowała wnioski końcowe. Pani mgr inż. Maria Stasińska-Jakubas jest dobrze przygotowana do dalszej pracy naukowej.



**Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marii Stasińskiej-Jakubas pt. „Egzogenna aktywacja szlaków biosyntezy metabolitów wtórnych oraz modulacja procesów fizjologicznych u wybranych gatunków roślin leczniczych” spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i na tej podstawie przedstawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Marii Stasińskiej-Jakubas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Przedłożona rozprawa doktorska stanowi wartościowe pod względem naukowym opracowanie, które w znacznym stopniu poszerza naszą wiedzę o użyteczności elicytacji w wybranych gatunkach roślin leczniczych. Na tej podstawie wnoszę wniosek o wyróżnienie Pani mgr inż. Marii Stasińskiej-Jakubas stosowną nagrodą.


Dr hab. Agnieszka Hanaka, prof. uczelni

