

Wpłynęło dnia:

14. 04. 2023

Dziekanat Wydziału  
Biotechnologii i Ogrodnictwa URK

Prof. dr hab. Antoni Banaś  
Katedra Biotechnologii Roślin  
Wydział Biotechnologii UG i GUMed  
ul. Abrahama 58  
80-307 Gdańsk

Gdańsk, 12-04-2023r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Bogumiły Florkiewicz

pt. „Przemiany hormonalne oraz modyfikacje struktury ściany komórkowej strefy odcinania kwiatów jako element odpowiedzi łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) na suszę glebową”

Rozprawa doktorska mgr Aleksandry Bogumiły Florkiewicz włącza się w nurt badań dotyczących poznawania mechanizmów regulujących aktywację strefy odcinania u kwiatów. Szczególną uwagę poświęca się w niej wpływowi suszy na ten proces, tj. stresorowi ostatnio coraz częściej występującemu w warunkach naszego klimatu w związku z postępującym globalnym ociepleniem. Wszystkie badania przeprowadzone zostały na kwiatach łubinu żółtego. Gatunek ten gromadzi w nasionach duże ilości białek zapasowych o korzystnym składzie aminokwasowym, które są cennym surowcem do produkcji pasz. Aby pasze wytwarzane na bazie nasion łubinu żółtego mogły skutecznie konkurować z paszami wytwarzanymi np. z nasion soi, plonowanie łubinu żółtego musiałyby być stosunkowo wysokie i stabilne. Niekorzystne czynniki środowiskowe np. pojawiające się w czasie kwitnienia okresy suszy są jednak przyczyną przyspieszonej i zwiększonej separacji kwiatów łubinu, co prowadzi często do obniżki plonów. W konsekwencji plonowanie łubinu żółtego jest mało przewidywalne i zniechęca rolników do jego uprawy. Znalezienie markerów, które umożliwiłyby w przyszłości wyselekcjonowanie odmian o zmniejszonej aborcji kwiatów podczas niekorzystnych warunków środowiskowych w okresie kwitnienia, przyczyniłoby się do poprawy plonowania łubinu żółtego i tym samym zwiększenia zainteresowania jego uprawą.

Badania prowadzone w ramach niniejszej pracy mogą się przyczynić do znalezienia w przyszłości takich markerów, a więc mają charakter nie tylko czysto poznawczy, ale mogą mieć również zastosowania praktyczne. Wyniki tych badań mogą mieć też ogólnobiologiczne znaczenie i dotyczyć aktywacji stref odcinania również innych organów jak owoce czy liście. **Podsumowując należy stwierdzić, że badania podjęte przez doktorantkę były trafne i w pełni uzasadnione.**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w oparciu o doświadczenia hodowlane, analizy cytologiczne, biochemiczne, proteomiczne i genetyczne oraz dostępną literaturę. Praca liczy 139 stron maszynopisu, w tym 25 stron wykazu literatury obejmującego aż 461 pozycji głównie angielsko języcznych oraz 20 tabel, 20 rycin i 2 schematów. Rozprawa została przygotowana starannie, jest napisana specjalistycznym językiem, a wyniki są prezentowane w przejrzysty sposób. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Praca zawiera 7 klasycznych części: **wstęp** zawierający przegląd piśmiennictwa – 20,1 % objętości rozprawy, **cel pracy** – 1,4%, **materiały i metody** – 14,5%; **wyniki** – 21,7%; **dyskusja** – 12,3%; **podsumowanie i wnioski** – 1,4% oraz **piśmiennictwo** – 18,1%. Dodatkowo praca zawiera oprócz strony tytułowej, stronę z podziękowaniami, 3 stronicowy opis finansowania badań oraz spis publikacji będących częściowo wynikiem tych badań a także wykaz dodatkowych osiągnięć publikacyjnych autorki. W pracy zamieszczono także **spis treści** – 1,4%, **wykaz stosowanych skrótów oraz łacińskich i polskich nazw gatunkowych** – 2,2%, **streszczenie** w języku polskim - 1,4%, **streszczenie** w języku angielskim – 1,4% oraz **spis schematów, rycin i tabel** – 1,4% objętości rozprawy.

„**Wstęp**” zawierający przegląd piśmiennictwa liczy 28 stron maszynopisu. Autorka rozpoczyna ten rozdział od ogólnego omówienia „stresu suszy” oraz odpowiedzi roślin na działanie tego stresora. W kolejnym podrozdziale autorka szczegółowo opisuje zmiany hormonalne występujące w roślinach pod wpływem suszu oraz udział poszczególnych hormonów w adaptacji roślin na działanie tego stresora. Dalej szczegółowo zreferowany zostaje wpływ suszy na zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu, a obroną antyoksydacyjną oraz omówiona zostaje

rola poszczególnych enzymatycznych i nieenzymatycznych sposobów usuwania reaktywnych form tlenu w odpowiedzi roślin na stres suszy. W kolejnym podrozdziale Autorka definiuje „strefę odcinającą”, przedstawia miejsce jej lokalizacji oraz omawia jej budowę. Przedstawia również dane na temat genów zaangażowanych w powstawanie tej strefy. Kolejno przedstawione zostają dane dotyczące udziału hormonów roślinnych w powstawaniu strefy odcinającej, ze szczególnym uwzględnieniem roli auksyn, etylenu, kwasu abscysynowego i jasmonianów. Na koniec tej części „Wstępu” Autorka podkreśla, że ostatecznym przejawem aktywacji strefy odcinania przez suszę, jest rozpuszczenie blaszek środkowych zespalających sąsiadujące komórki, co prowadzi do utraty integralności i przerwania tkanek. Jako konsekwencję tego stwierdzenia w dalszej części „Wstępu” Autorka omawia budowę ściany komórkowej oraz charakteryzuje enzymy uczestniczące w procesie modyfikowania tej struktury komórkowej. Tą część „Wstępu” kończy omówieniem aktualnych danych literaturowych dotyczących modyfikacji ściany komórkowej pod wpływem stresu suszy.

**Dobór tematów omawianych w diskutowanym rozdziale jest prawidłowy i dobrze wprowadza czytelnika do problematyki badawczej, której poświęcona jest praca. Uzupełnienie treści tekstowych 2 schematami dodatkowo rozjaśnia prezentowaną tematykę. Cytowana literatura została prawidłowo dobrana i cytowana.**

„Cel pracy” przedstawiony został na dwóch stronach maszynopisu. Autorka rozpoczyna od stwierdzenia, że plonowanie łubinu żółtego zależy od utrzymania kwiatów na roślinie, a to z kolei determinuje funkcjonowanie strefy odcinania. Dalej wskazuje, że mechanizmy regulujące odcinanie kwiatów łubinu badane są przez naukowców z Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu od 2005 roku i podkreśla, że praca jest kontynuacją tych badań. Dalej wskazuje, że celem pracy jest identyfikacja nowych elementów zdarzeń zachodzących w „strefie odcinania” kwiatów łubinu żółtego pod wpływem suszy glebowej. Kolejno w punktach przedstawia sposób, w jaki planuje osiągnąć postawiony cel badań. **Rozdział napisany jest jasno i dobrze określa cel badań, jakie Autorka zaplanowała wykonać w ramach pracy doktorskiej.**

Trzeci rozdział rozprawy to „**Materialy i metody**”. Liczy on 20 stron maszynopisu. W kolejnych podpunktach tego rozdziału czytelnik jest informowany o: 1) materiale roślinnym czyli łąbinie żółtym oraz o warunkach jego uprawy i sposobie pobierania materiału do badań; 2) odczynnikach, zestawach komercyjnych, buforach i roztworach podstawowych, żelach do elektroforezy, pożywkach, antybiotykach i markerach wielkości oraz oprogramowaniach stosowanych w badaniach; 3) analizach molekularnych w tym: izolacji RNA, analizach transkryptomicznych, badaniach ekspresji genu *LILOX2* 4) analizach białek w tym: izolacji białek, technice „dot blot”, proteomicznej analizie jakościowej rozdzielonych białek metodą odcisku palca peptydowego i identyfikacji tych białek przy wykorzystaniu baz danych; 5) metodach mikroskopowych w tym: utrwalaniu materiału, zatapianiu materiału w żywicy, barwieniu preparatów do analiz histologicznych, immunolokalizacji badanych związków; 6) oznaczeniach chromatograficznych auksyny i kwasu jasmonowego; 7) oznaczaniach zawartości proliny, pektyn i hemiceluloz oraz dialdehydu malonowego; 8) zastosowanych analizach statystycznych.

**Lektura tego rozdziału pozwala w przystępny sposób zapoznać się czytelnikowi z warunkami przeprowadzonych doświadczeń i upewnia recenzenta w przekonaniu, że Autorka swobodnie porusza się wśród stosowanych technik badawczych. Jednocześnie pragnę podkreślić, że opis przeprowadzanych analiz biochemicznych, genetycznych i cytologicznych, jest na tyle szczegółowy że może pozwolić czytelnikowi na powtórzenie danej analizy bez zaglądania do danych literaturowych co moim zdaniem jest niezwykle cenne przy tego typu opracowaniach. Prace doktorskie służą bowiem często innym studentom (magistranci, doktoranci) do zapoznawania się z daną metodyką badawczą.**

Kolejny rozdział prezentowanej rozprawy to „**Wyniki**”. Rozdział ten liczy 30 stron i jest najobszerniejszym rozdziałem pracy. Zawiera on 19 wysokiej jakości rycin oraz 8 tabel które obrazują uzyskane przez Autorkę wyniki badań. Ryciny i tabele przemieszane są z tekstem, w którym Autorka komentuje prezentowane wyniki. Omawianie wyników Autorka rozpoczyna od weryfikacji efektywności działania suszy glebowej na odcinanie kwiatów łąbinu. Potwierdza w nich wcześniejsze ustalenia o

dużym wzroście aborcji kwiatów łubinu (do około 92%) pod wpływem tego stresora. Kolejno, Autorka prezentuje zmiany cytologiczne zachodzących w strefie odcinania pod wpływem suszy, a dalej dane dotyczące zawartości aldehydu malonowego (MDA) oraz fosfolipazy D (PLD) w strefie odcinania kwiatów roślin kontrolnych i poddanych działaniu suszy. Wykazuje w nich oprócz zmian cytologicznych podwyższoną zawartość MDA oraz PLD konkludując, że świadczy to o wzmożonych przemianach fosfolipidów strefy odcinania pod wpływem działania badanego stresora. Dalej pokazuje dane wskazujące, na zwiększenie zawartości, w strefie odcinającej roślin poddanych działaniu suszy, proliny – jednego z osmoprotektantów.

W kolejnym etapie badań Autorka określa zmiany poziomu auksyn (IAA) i kwasu jasmonowego (JA) w strefie odcinającej kwiatów łubinu pod wpływem suszy. Wykazuje, że poziom IAA wzrósł o około 70% a poziom kwasu jasmonowego aż o prawie 300%. Stosując immunodetekcję pokazuje lokalizację subkomórkową IAA. Prawdopodobnie brak odpowiednich przeciwciał uniemożliwił wykonanie podobnego „zdjęcia” dla subkomórkowej lokalizacji JA, jednakże w tym przypadku autorka dołącza „zdjęcie” z immunodetekcji lipooksygenazy (LOX), enzymu uczestniczącego w szlaku biosyntezy JA. Ponadto, wykazuje, wzrost zawartości odpowiedniej iz formy LOX w strefie odcinania pod wpływem suszy stosując badania biochemiczne. Wykazuje również, że pod wpływem suszy w strefie odcinania zmniejsza się bardzo mocno zawartość białka represorowego JAZ (badania biochemiczne z użyciem odpowiednich przeciwciał), co umożliwia aktywację czynnika transkrypcyjnego MYC, regulującego ekspresję genów zależnych od jasmonianów. Wzrost zawartości MYC w komórkach strefy odcinania wykazuje za pomocą immunodetekcji z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał.

W kolejnej części pracy Autorka omawia zmiany zachodzące w składzie ścian komórkowych strefy odcinającej pod wpływem suszy. Rozpoczyna od zmian zawartości pektyn. Wykazuje, że pod wpływem suszy wzrasta całkowita zawartość pektyn w komórkach strefy odcinającej. Dane te przedstawia jednak na jednostkę świeżej masy. W związku z tym, moje pytanie do dyskusji to ”czy sucha masa komórek strefy odcinania pozostawała podobna jak w kontroli po zadziałaniu stresora suszy, czy też się zwiększała, a w związku z tym czy nie lepiej byłoby podać zawartość pektyn w przeliczeniu na suchą masę? Dalsze badania dotyczyły zmian, w jakości pektyn po zadziałaniu stresora suszy.

Już na początku tych badań przeprowadzonych z zastosowaniem czerwieni rutenowej (barwiącej intensywnie pektyny niezestryfikowane) wykazano, że susza zwiększała znacznie zawartość deestryfikowanych pektyn w komórkach strefy odcinania. W dalszych badaniach wykazano zaś, że pod wpływem suszy w komórkach strefy odcinania następuje wzrost zawartości metylotransferazy pektynowej (PME) katalizującej reakcje demetylacji pektyn oraz wzrost zawartości poligalaktouronazy (PG) hydrolizującej wiązania łączące deestryfikowane pektyny, co prowadzi do zmniejszenia adhezji komórek. Wykorzystując specyficzne antyciała wykazano dalej, między innymi, że ilość nisko-metylowanych homogalaktouronanów (głównej grupy pektyn) znacząco wzrasta w komórkach strefy odcinania pod wpływem suszy. W kolejnych zaś badaniach określona została subkomórkową lokalizację innych grup pektyn tj. galaktanów, arabinanów oraz ksylogalakturonanów w komórkach strefy odcinającej i komórkach stref do niej przylegających (wykorzystując specyficzne antyciała) oraz wpływ suszy na tą lokalizację. W kolejnych badaniach autorka określiła zmiany zachodzące pod wpływem suszy w zawartości i lokalizacji hemiceluloz w komórkach strefy odcinania i stref przylegających do niej. Badania dotyczące zmian składu ścian komórkowych strefy odcinania autorka kończy określeniem zawartości ekstensyn w komórkach strefy odcinania kwiatów łubinu i zmian tej zawartości pod wpływem suszy.

Podczas immunodetekcji różnych składników ścian komórkowych sygnał fluorescencji występował często nie tylko w ścianach komórkowych, ale również w cytoplazmie przylegającej do ścian. Moje pytanie do dyskusji dotyczy „na ile sygnał odnotowany w cytoplazmie rzeczywiście pochodził od zlokalizowanych tam elementów tej ściany (np. synteza w Aparacie Golgiego i transport) czy też mógł być promieniowaniem silnej fluorescencji ścian komórkowych na otaczające obszary cytoplazmy?”.

W ostatniej części badań prezentowanych w rozdziale „Wyniki” Autorka przeprowadza skomplikowaną analizę zmian jakości białek strefy odcinania pod wpływem suszy. Początkowa analiza pojawiających się prążków białek podczas rozdziału metodą elektroforezy, została pogłębiona o analizę nowo pojawiających się pod wpływem suszy prążków białek metodami „odcisku palca mapy peptydowej” oraz „MALDI-TOF/TOF”. Bazując na dostępnych online bazach danych, nowo pojawiające się pod wpływem suszy białka zostały zidentyfikowane i przypisane do odpowiednich grup tych związków. W

ramach pracy przeprowadzono też analizę transkryptomiczną RNA komórek strefy odcinania kwiatów łubinu z warunków kontrolnych i poddanych stresowi suszy. W pracy wybrano z tych analiz geny związane z reorganizacją ściany komórkowej i zmiany w stopniu ich ekspresji przedstawiono w tabeli. Należy podkreślić, że przeprowadzenie tak skomplikowanych analiz proteomicznych i transkryptomicznych, świadczy o bardzo wysokich kompetencjach Autorki.

**Wszystkie wyniki badań przedstawione są w sposób zwięzły i jasny, w sposób niesprzający większych problemów z ich zrozumieniem i interpretacją.**

Dyskusję uzyskanych wyników Autorka przeprowadziła na 18 stronach maszynopisu. Jest to stosunkowo długa dyskusja. Obszerność dyskusji uzasadnia jednak złożoność problemu. Zmiany na poziomie biochemicznym, cytologicznym, transkryptomicznym i proteomicznym zachodzące w „strefy odcinania” podczas wpływu suszy to procesy bardzo złożone kontrolowane na wielu poziomach. **W rozdziale tym Autorka udowadnia, że doskonale zna literaturę dotyczącą przedmiotu prowadzonych badań i potrafi konfrontować wyniki badań własnych z danymi literaturowymi. Rozdział ten napisany jest dobrym językiem w sposób, który pokazuje „dojrzałość naukową” Autorki.**

Pracę kończy podsumowanie składające się **5 punktów** oraz **wniosku końcowego**, które dobrze oddają najważniejsze stwierdzenia wynikające z przeprowadzonych badań.

Zarówno w Dyskusji jak i we wcześniejszych rozdziałach pracy (Streszczenie, Wyniki) Autorka używa skrótu myślowego: „aktywacja fosfolipazy D prowadzi do powstania prekursora jasmonianów”. Prosiłbym by w ramach dyskusji prowadzonej podczas obrony autorka rozwinęła ten skrót myślowy.

W recenzowanej pracy występują tzw. „literówki” oraz drobne błędy stylistyczne. Ich ilość jest jednak stosunkowo mała w porównaniu do większości tego typu prac. Autorka używa też zbyt często skrótów (zamiast pełnych nazw), co nieco utrudnia

czytanie pracy. Te drobne uchybienia nie mają jednak znaczącego wpływu na poprawność językową pracy, jako całości.

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Bogumiły Florkiewicz stanowi ważny wkład w poznawanie mechanizmów dotyczących wpływu suszy na odcinanie kwiatów, a pośrednio i innych organów roślin. Przedstawiona praca świadczy, że Autorka dobrze opanowała wiele technik badawczych oraz zna piśmiennictwo w zakresie badanego przedmiotu. Pracę oceniam bardzo pozytywnie i uważam, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Stawiam w związku z tym wniosek do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Bogumiły Florkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy.

KIEROWNIK  
Zakładu Biochemii Roślin  
*Antoni Banas*  
prof. dr. hab. Antoni Banas

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie:

1. Część wyników pracy doktorskiej została opublikowana; trzy artykuły naukowe, w jednym z nich doktorantka jest pierwszym autorem.
2. W pracy zastosowano bardzo wiele technik badawczych; metody biochemiczne, cytologiczne, transkryptomocjne, proteomiczne. Z sukcesem połączono i przedyskutowano wyniki uzyskane tymi różnymi metodami badawczymi.

KIEROWNIK  
Zakładu Biochemii Roślin  
*Antoni Banas*  
prof. dr. hab. Antoni Banas