



Toruń, 4 maja 2023 r.

Dr hab. Maciej Ostrowski, prof. UMK

Katedra Biochemii

Instytut Biologii

Recenzja pracy 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”

Wprowadzenie

Przedmiotem badań przedstawionych w przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest łubin żółty, ważna z rolniczego punktu widzenia, roślina z rodziny bobowatych. Fakt, że nasiona łubinu charakteryzują się wysoką zawartością białka, stawia tę roślinę w centrum zainteresowania wśród hodowców roślin strączkowych. Jednym z czynników ograniczających otrzymywanie wysokich plonów łubinu jest przedwczesne odcinanie kwiatów, co uniemożliwia otrzymanie, bogatych w białka, nasion. Jak wskazują dane, mniej niż połowa kwiatów wykształci strąki zawierające te cenne nasiona. Kluczowe dla odcinania organów jest powstanie strefy odcinania, struktury w której zmiany molekularne, biochemiczne i cytologiczne, prowadzą do separacji organów. Zatem badania mające na celu zrozumienie przebiegu procesu odcinania, a co ważniejsze jego regulacji, są bardzo ważne. Temat ten na początku XXI wieku został podjęty przez zespół badawczy Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i skupiał się, zważywszy na zainteresowania badaczy, na roli fitohormonów w procesie odcinania organów. Autorka niniejszej dysertacji podjęła się zbadania wpływu suszy glebowej – istotnego w kontekście ostatnich zmian klimatycznych - czynnika środowiskowego regulującego procesy fizjologiczne roślin, na elementy szlaków hormonalnych auksyn i jasmonianów oraz zmiany biochemiczne i strukturalne w obrębie ścian komórek strefy odcinania.



Dane formalne o rozprawie

Oceniana rozprawa została przygotowana pod kierunkiem promotorki dr hab. Emilii Wilmowicz, prof. UMK (Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu) oraz promotorki pomocniczej, dr Agaty Kućko (Katedra Fizjologii Roślin SGGW w Warszawie). Pracę doktorską wykonano w trybie eksternistycznym w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu. Głównym źródłem finansowania badań w ramach niniejszej pracy był „Diamentowy Grant” przyznany pani Florkiewicz przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego i realizowany w latach 2019 – 2021.

Część wyników zaprezentowanych w rozprawie zostało opublikowanych w postaci trzech artykułów o zasięgu międzynarodowym w czasopismach z kwartyłu Q1 listy czasopism (dwie prace w *International Journal of Molecular Sciences*, jedna praca w *Plants*). Pani magister Florkiewicz przedstawiała rezultaty swoich badań także podczas kilku konferencji krajowych.

Praca została napisana w języku polskim i składa się z typowych dla rozpraw doktorskich rozdziałów. Dysertacja liczy 140 stron. Bibliografia obejmuje 461 pozycji literaturowych z czego prawie 150 stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich dziesięciu lat, w tym 60 pozycji z lat 2017-2022. Tak duża liczba publikacji na które powołuje się Autorka wynika ze złożoności tematu rozprawy (odcinanie organów, stres suszy, fitohormony, ściana komórkowa, markery stresu). Odnosi się jednak wrażenie, że w niektórych miejscach cytowania są nadmierne. Wyraźnie dominującą częścią rozprawy jest Wstęp (prawie 42 strony), co w porównaniu z omówieniem wyników (28 stron) i dyskusją (16 stron) stanowi pewną dysproporcję poszczególnych rozdziałów.

Ocena poszczególnych rozdziałów rozprawy

Temat pracy został prawidłowo sformułowany i jest zgodny z jej treścią. Wstęp stanowi przegląd literatury tematu, wprowadza w zagadnienie suszy i charakteryzuje jej rodzaje (glebową, atmosferyczną, hydrologiczną). Następnie omówiono różne aspekty odpowiedzi fizjologicznych roślin na stres suszy. W tym fragmencie Autorka wymienia główne zmiany anatomiczne, fizjologiczne i biochemiczne, które stanowią odpowiedź roślin na czynnik stresowy. Przedstawiono także niektóre geny i kodowane przez nie białka, których ekspresja zmienia się w warunkach suszy. Przykłady białek stanowią bardzo różnorodną grupę (np. zarówno czynniki transkrypcyjne, jak i różne enzymy: kinazy białkowe regulujące transkrypcję, CDPK, MAPK, fosfolipazy). ***Dlaczego akurat o nich Autorka postanowiła wspomnieć we Wstępie ?*** Szerzej omówiono dehydryny i





akwaporyny, bezpośrednio zaangażowane w regulację bilansu wodnego rośliny. Według recenzenta niepotrzebny jest fragment dotyczący ubikwitynylacji i sumoilacji białek w warunkach suszy. Temat modyfikacji potranslacyjnych białek w warunkach stresowych jest tak obszerny, że wykracza daleko poza wspomniane dwie modyfikacje, a poza tym nie stanowi części badawczej niniejszej rozprawy. Cennym jest zwrócenie uwagi Autorki na zaburzenia gospodarki mineralnej roślin podczas suszy. Jednak fragment ten bardziej pasowałby w nieco wcześniejszej części Wstępu, gdzie Autorka omawia odpowiedzi fizjologiczne rośliny. W dalszej części przybliżono bardzo złożony temat regulacji hormonalnej odpowiedzi roślin na suszę. W tej części przedstawiono zależność między poziomem ABA i cytokinin, a stężeniem auksyny. Fragment dotyczący molekularnych podstaw działania auksyn jest niejasny. Na stronie 21 Autorka pisze o zmianie homeostazy IAA w wyniku aktywacji („czynnika” ?) TLD1/OsGH3.13. w siewkach ryżu, powołując się na pracę Du i wsp. (2012). W rzeczywistości TLD1/OsGH3.13 to syntetaza IAA-aminokwasu, która obniża stężenie wolnego IAA w warunkach suszy. Również część dotycząca roli jonów wapnia w kaskadzie sygnalizacyjnej auksyn wprowadza zamieszanie. Część omawianych prac (Zbell 1996, Sadiqov i wsp. 2002) powstała przed opisaniem białka TIR1 jako receptora auksyn (2005) i dotyczy tzw. błonowego receptora ABP1, kwestionowanego przez wiele lat jako miejsce percepcji fitohormonu. ***Przy tej okazji, chciałbym poprosić Autorkę o przedstawienie aktualnej koncepcji receptora/receptorów auksyn.*** Następnie Autorka przechodzi do omówienia biosyntezy i molekularnych podstaw percepcji jasmonianów. Szkoda, że w podobny sposób nie opisano działania auksyn. Omawiając fizjologiczne działanie jasmonianów, Autorka pisze głównie o kwasie jasmonowym (JA). ***Czy znane są dowody na bezpośrednie działanie kwasu jasmonowego na receptor COI1 ? Czym uzasadnia się efekty fizjologiczne wolnego JA ?***

W dalszej części przedstawiono udział reaktywnych form tlenu w stresie, budowę strefy odcinania oraz procesy hormonalne zachodzące podczas suszy. Z uwagi na fakt, że jednym z celów badawczych była analiza zmian ścian komórek strefy odcinania, scharakteryzowano składniki chemiczne oraz enzymy uczestniczące w zmianach strukturalnych ściany komórkowej. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę na niepoprawne stosowanie nazw cukrów – poprawna nazwa to ... uroniany, np. galaktouroniany, chociaż w literaturze znane są liczne przykłady formy błędnej np. „galaktouronan”.

Treść całego Wstępu zilustrowano tylko dwoma schematami (mogły być zatytułowane jako ryciny i konsekwentnie numerowane), Dla lepszego zrozumienia treści





tak obszernie omawianych treści, np. powiązań między poszczególnymi szlakami hormonalnymi, przydałaby się większa ilość rycin.

Cel pracy został bardzo jasno sformułowany, przejrzysto wymieniono zadania badawcze służące realizacji postawionego celu. Autorka, uzasadniając podjęcie tematu będącego kontynuacją badań Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK w Toruniu, przedstawiła w syntetyczny sposób dotychczasowe osiągnięcia badaczy tego zespołu.

W rozdziale „Materiały i metody” opisano odmianę łubinu żółtego jako modelu badawczego, zwrócono uwagę na problemy wynikające z przedwczesnego opadania kwiatów. Przedstawiono bardzo precyzyjnie warunki uprawy, które zostały wcześniej opracowane i opublikowane w pracach z udziałem Pani profesor Wilmowicz. W kolejnym podrozdziale bardzo szczegółowo zestawiono w tabelach odczynniki użyte w badaniach, a w niektórych przypadkach nawet skład chemiczny tych odczynników. Eksperymentator chcący przeprowadzić te doświadczenia, nie powinien mieć zatem problemów z ich odtworzeniem. W tym miejscu zwrócę tylko uwagę na niefortunną nazwę *‘bufor szczawianu amonu’*, jaka pojawiła się w Tabeli 2 (str.48). Mało precyzyjnie brzmi fragment dotyczący przygotowania próbki do SDS-PAGE (str. 54): *‘...do 25 µg białka dodawano 1x bufor redukujący...’*. Na tej podstawie nie można stwierdzić, jak przygotowano tę próbkę. Opisując metodę elektroforezy jednokierunkowej (str.55) nie podano wartości pH buforu elektrodowego MES. Z drobniejszych uwag, na stronie 62, przy opisie analizy jasmonianów pojawiło się błędne określenie *‘żel krzemionkowy SPE związany z Backerem...’*.

W kolejnej części pracy Autorka przedstawia wyniki swoich badań zaczynając od wykazania, że susza glebowa zwiększa aborcję kwiatów łubinu. Jest to wynik kluczowy dla dalszych analiz przedstawionych w niniejszej pracy. Ocena mikroskopowa wykazała zmiany cytologiczne w obrębie strefy odcinania. W celu weryfikacji hipotezy, że warunki suszy glebowej mają wpływ na strukturę błon komórkowych, analizowano poziom dialdehydu malonowego. Wynik ten ma podwójne znaczenie dla omawianych badań. Po pierwsze wskazuje na peroksydację lipidów w warunkach stresowych, a po drugie kieruje uwagę w stronę jasmonianów, których prekursorem jest kwas tłuszczowy uwalniany właśnie z lipidów błonowych. Mam tylko wątpliwość, czy Autorka podając wartość MDA w nmolach/ml FW (Tabela 13, str. 67) rzeczywiście miała na myśli tę jednostkę (raczej nmol/ml lub nmol/g FW). W metabolizm lipidów zaangażowana jest także fosfolipaza D (PLD), której poziom został oznaczony metodą pół-ilościowego Western blottingu. Pani magister Florkiewicz zwróciła uwagę na różnice pomiędzy izoformami PLD u roślin kontrolnych i poddanych suszy. Uważam, że jest to bardzo cenny wynik sugerujący istotne znaczenie tego enzymu (lub określonej izoformy ?) w odpowiedzi roślin na suszę. Na





rycinie 4B widać, że PLD wyraźnie dominuje w obu wariantach badawczych, rzadko się bowiem zdarza, że na proteinogramie z homogenatu nie widać innych białek. Co ciekawe, na Ryc. 6B (str.71) przy okazji innego doświadczenia, na elektroforegramie SDS-PAGE widać więcej prążków w wariacie suszy. ***Czym Doktorantka wyjaśniłaby różnice pomiędzy liczbą prążków na Ryc. 4B i 6B ?***

Następnym zadaniem było wyjaśnienie regulacji homeostazy auksyn i jasmonianów w warunkach suszy glebowej w strefie odcinania. Jak wiadomo, aborcja organów pozostaje pod kontrolą hormonalną, a na precyzyjną regulację poziomu fitohormonów składają się takie czynniki jak: synteza, transport, degradacja i koniugacja cząsteczek hormonalnych. Obie grupy hormonów Doktorantka badała różnymi metodami. Auksyny oznaczano ilościowo metodą GC-MS oraz lokalizowano ich obecność w komórkach AZ metodą immunofluorescencyjną. Wykazano prawie dwukrotny wzrost stężenia IAA w AZ w warunkach suszy w porównaniu z kontrolą. Analizy mikroskopowe wykazały zmiany lokalizacji auksyny w konkretnych komórkach strefy AZ. W przypadku jasmonianów zastosowano więcej metod, oprócz stężenia JA, oznaczono też poziom ekspresji genu *LILOX2* oraz poziom białka LOX, a dystrybucję lipooksygenazy oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym. Biorąc pod uwagę szlak sygnałowy jasmonianów, oznaczono też poziom represora czynników transkrypcyjnych JAZ1 oraz analizowano lokalizację czynnika transkrypcyjnego MYC2 w komórkach AZ. Po lekturze tej części wyników nasuwają się następujące pytania:

- 1) ***Dlaczego mając przeciwciała anti-JAZ1 i anti-MYC2, Autorka nie przeprowadziła analiz Western blot białka MYC2 i immunolokalizacji JAZ1 ? Ich rezultaty mogłyby ułatwić analizę porównawczą badanych białek i dostarczyć argumentów do dyskusji np. dotyczącej kolokalizacji składników szlaku sygnalizacyjnego - JAZ1 i MYC2 w jądrze komórkowym***
- 2) ***Autorka powołuje się na pracę Kućko i wsp. (2022) w której zidentyfikowano gen LILOX2 w strefie odcinania. Czy znane są inne geny LILOX kodujące izoenzymy lipooksygenaz roślinnych, które mogłyby wpływać na poziom jasmonianów ? Obecność kilku prążków białkowych LOX na Ryc. 6A sugeruje obecność izoform lub izoenzymów***
- 3) ***Dlaczego nie analizowano ekspresji/aktywności białek COI1 i JAR1 w kontekście sygnalizacji jasmonianów ? Wiadomo że aktywną formą kwasu jasmonowego wiążącego się z receptorem COI1 jest jego koniugat JA-Ile syntetyzowany przez enzym JAR1 z rodziny GH3.***





Podsumowując tę część wyników, stwierdzam, że wnoszą one sporo informacji do wiedzy na temat wpływu fitohormonów na strefę odcinania w warunkach suszy. ***Chciałbym poznać opinię Doktorantki w temacie wykorzystania tych wyników do planowania ewentualnych dalszych badań nad hormonalną regulacją odcinania organów.***

Obserwowane zmiany strukturalne w obrębie komórek strefy odcinania oraz wcześniejsze badania prowadzone w zespole prof. Wilmowicz, skłoniły Autorkę do przyjrzenia się składnikom chemicznym ścian komórkowych. Analizy biochemiczne wykazały wzrost zawartości pektyn w strefie odcinania w warunkach suszy. ***Doktorantka przedstawia wynik poziomu pektyn w $\mu\text{g/g}$ FW (Tabela 17, str. 76), natomiast w „Materiałach i metodach” nie zauważyłem opisu z którego wynikałoby jak wartość absorbancji przy długości fali 280 nm przeliczano na ilość pektyn. Czy użyto krzywej kalibracyjnej ?***

Bardzo szerokiej analizie poddano przemiany zachodzące w obrębie ściany komórkowej, lokalizowano nie tylko jej składniki chemiczne, ale i obecność enzymów remodelujących ścianę komórkową i ekstensyn. Tę część wyników uważam za bardzo dokładnie opisaną. Następnie przeprowadzono analizy proteomiczne i transkryptomocne oceniające pojawianie się lub znikanie białek/transkryptów w badanym procesie. Badania te służą poznaniu białek zaangażowanych w formowanie się strefy odcinania w warunkach suszy. Analizę proteomiczną przeprowadzono rozdzielając białka metodą jednokierunkowej elektroforezy w warunkach denaturujących, a wycięte z żelu polipeptydy były analizowane metodą MALDI-TOF. W rezultacie otrzymano kilkadziesiąt białek z których część, jak już wiadomo, uczestniczy w aborcji organów (np. IDA-LIKE, czy omówione wcześniej ekstensyny oraz enzymy remodelujące polisacharydy ściany komórkowej). Do wybarwienia żelu użyto błękitu Coomassie. ***Dlaczego nie zastosowano barwienia białek azotanem (V) srebra, który pozwala wykryć znacznie więcej białek ? Autorka przygotowując próby do trawienia enzymatycznego korzystała z metody Shevchenko i wsp. (1996), gdzie barwienie srebrem jest dobrze opisane. Czy rozważano wykonanie elektroforezy dwukierunkowej 2-DE (IEF/SDS-PAGE) w celu dokładniejszego rozdzielenia białek do analizy proteomicznej ?***

Kończąc ocenę części dotyczącej wyników, należy podkreślić, że pani magister Florkiewicz przeprowadziła wszechstronną analizę zmian w poziomie auksyn i jasmonianów oraz badania modyfikacji ścian komórkowych AZ podczas odpowiedzi hubinu żółtego na suszę. Otrzymane wyniki znacznie poszerzają stan wiedzy w tym temacie.





W rozdziale „ Dyskusja” Doktorantka skonfrontowała wyniki uzyskane w swojej pracy z badaniami innych autorów. W sposób jasny i logiczny uzasadniono podejmowanie kolejnych zadań badawczych służących weryfikacji stawianych hipotez. Część rezultatów otrzymanych przez magister Florkiewicz wprowadza nowe argumenty do dyskusji problemu jakim jest odcinanie organów generatywnych roślin. Na koniec sformułowano pięć wniosków będących syntezą uzyskanych rezultatów oraz wynikający z nich wniosek końcowy.

Wniosek końcowy

Uważam że Pani magister Aleksandra Florkiewicz podjęła istotny dla nauki problem badawczy. Zaprezentowane badania pozwoliły zweryfikować hipotezy przyjęte przez Autorkę jako cel pracy. Opanowanie przez Doktorantkę szerokiego warsztatu badawczego i otrzymanie grantu, nie budzą wątpliwości co do dalszego rozwoju naukowego Pani magister.

W związku z tym wnoszę do Rady dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr Aleksandry Florkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Biochemii
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
(2284)