

Prof. dr hab. Antoni Banaś

Gdańsk, 27-05-2019

Katedra Biotechnologii

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

ul. Abrahama 58

80-307 Gdańsk

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Panek

pt. „Mechanizmy aktywujące strefę odcinania kwiatów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) oraz ich funkcjonowanie w warunkach suszy glebowej”

Rozprawa doktorska mgr Katarzyny Panek włącza się w nurt badań dotyczących poznawania mechanizmów regulujących aktywację strefy odcinania u kwiatów. Wydaje się jednak, że wyniki tych badań mogą mieć bardziej ogólnobiologiczne znaczenie i dotyczyć aktywacji stref odcinania również innych organów jak owoce czy liście. 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. Znalazienie 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. **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 i genetyczne oraz dostępną literaturę. Praca jest obszerna i liczy 162 stron maszynopisu, w tym 20 stron wykazu literatury obejmującego 379 pozycji głównie angielsko języcznych oraz 19 tabel, 32 rycin i 27 fotografii. Rozprawa została przygotowana starannie, jest napisana zrozumiałym 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 – 13,6 % objętości rozprawy, **cel pracy** – 1,2%, **materiały i metody** – 21,6%; **wyniki** – 30,9%; **dyskusja** – 13,0%; **podsumowanie wyników i wniosek** – 0,6% oraz **piśmiennictwo** – 12,3%. Dodatkowo praca zawiera **streszczenie** w języku polskim - 0,6%, **streszczenie** w języku angielskim – 0,6% oraz **wykaz skrótów** – 1,8% objętości rozprawy.

„**Wstęp**” zawierający przegląd piśmiennictwa liczy 22 strony maszynopisu. Autorka rozpoczyna ten rozdział od ogólnego omówienia procesu separacji organów i fizjologicznego znaczenia tego procesu. W kolejnym podrozdziale definiuje „strefę odcinającą”, przedstawia miejsce jej lokalizacji oraz omawia jej budowę. Przedstawia również obecny stan wiedzy na temat genów zaangażowanych w powstawanie tej strefy. Dalej autorka przedstawia model odcinania organów, czyli cykl zjawisk które następują po aktywacji „strefy odcinającej”. W kolejnym podrozdziale autorka omawia aktualny stan badań dotyczących zmian biochemicznych przebiegających po aktywacji „strefy odcinania”. Skupia się między innymi na enzymach hydrolitycznych, reaktywnych formach tlenu oraz roli fitohormonów takich jak auksyny czy etylen w tych przemianach. W następnym podrozdziale autorka przedstawia model genetycznej kontroli procesu aktywacji „strefy odcinającej”. Podkreśla, że podstawowym elementem aktywującym „strefę odcinana” jest białko IDA stanowiące funkcję liganda dla kinaz receptorowych. Utworzenie kompleksu IDA z tymi kinazami uruchamia kaskadę zdarzeń, które w konsekwencji aktywują geny których produkty zaangażowane są między innymi w

hydrolizę składników ścian komórkowych. Podkreśla, że geny kodujące to białko zostały zidentyfikowane w wielu gatunkach roślin. Kolejno omówiona została hormonalna kontrola ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w aktywację i późniejsze funkcjonowanie „strefy odcinania”. Autorka podkreśla tu rolę kwasu abscysynowego oraz etylenu. Omawia również potencjalną rolę innych fitohormonów. W kolejnych podrozdziałach omawiana jest biosynteza kwasu abscysynowego oraz etylenu oraz rola/sposób działania tych fitohormonów w odcinaniu organów. W ostatnim podrozdziale „wstępu” omówiony jest „stres wodny” oraz jego wpływ na rozwój roślin, ze szczególnym podkreśleniem wpływu suszy na aktywację „strefy odcinania”.

Dobór tematów omawianych w diskutowanym rozdziale jest prawidłowy i dobrze wprowadza czytelnika do problematyki badawczej, której poświęcona jest praca. Uzupełnienie treści tekstowych 5 rycinami i 1 tabelą dodatkowo rozjaśnia prezentowaną tematykę. Cytowana literatura została prawidłowo dobrana i cytowana.

Dwustronicowy „**Cel pracy**” Autorka rozpoczyna od uzasadnienia wyboru łubinu żółtego do planowanych badań. Podkreśla potencjalne gospodarcze znaczenie tego gatunku i wskazuje na obecne problemy z jego szerokim zastosowaniem w praktyce rolniczej. Autorka wskazuje również, że praca będzie kontynuacją badań, które prowadzone są w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu od 2005 roku. Szczególnym celem pracy będzie zaś identyfikacja nowych elementów regulujących funkcjonowanie „strefy odcinania”. 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 „**Materiały i metody**”. Liczy on 35 stron maszynopisu. W kolejnych podpunktach tego rozdziału czytelnik jest informowany o: 1) materiale roślinnym, czyli łubinie żółtym na którym przeprowadzono badania oraz o warunkach jego uprawy; 2) sposobie pobierania materiału roślinnego do badań czyli o sposobie selekcji fragmentów kwiatów zawierających „strefę odcinającą”; 3) syntetycznym

polipeptydzie EPIP oraz egzogennych fitohormonach wykorzystywanych w badaniach; 4) odczynnikach, zestawach komercyjnych, buforach i roztworach podstawowych, żelach do elektroforezy, pożywkach, antybiotykach i markerach wielkości oraz oprogramowaniach stosowanych w badaniach; 5) pomiarach cech biometrycznych roślin podczas badań wpływu suszy, sposobach oznaczania wilgotności tkanek, metodzie mikrofalowej mineralizacji materiału roślinnego oraz sposobie oznaczania w nim mikro- i makro-elementów; 6) metodach biologii molekularnej stosowanych w izolacji RNA oraz określaniu jego ilości i jakości, metodach wykorzystywanych w reakcjach RT-PCR, metodach klonowania produktów reakcji RT-PCR, metodach analizy ekspresji genów w czasie rzeczywistym; 6) metodach mikroskopowych; 7) oznaczeniach chromatograficznych ABA i ACC; 8) analizach SDS-PAGE i technikach „western blot” wykorzystywanych w badaniach.

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 zaglądanía 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 50 stron i jest to najobszerniejszym rozdział pracy. Zawiera on 24 fotografie oraz 27 rycin, które obrazują uzyskane przez Autorkę wyniki badań. Fotografie i ryciny przemieszane są z tekstem, w którym Autorka komentuje prezentowane wyniki. Omawianie wyników Autorka rozpoczyna od badań, które doprowadziły do uzyskania sekwencji cDNA genu *LIIDL* kodującego białko IDL u łubinu żółtego. Dalej autorka przedstawia dendrogram porównujący sekwencje aminokwasowe *LIIDL* z sekwencjami *IDA/IDL* zidentyfikowanymi u innych gatunków roślin. Przedstawia również porównanie domeny EPIP zlokalizowanej w obrębie *LIIDL* z domenami EPIP występującymi w

odpowiednich białkach innych gatunków roślin. Kolejno omówione są badania, które doprowadziły do identyfikacji pełnej sekwencji cDNA genów kodujących kinazy LIHSL i LIMP6 (uczestniczące w aktywacji „strefy odcinania”) u łubinu żółtego. Oprócz uzyskania pełnej sekwencji cDNA tych genów wykonano również dendrogram porównujący sekwencje aminokwasowe białka LIHSL z sekwencjami aminokwasowymi innych roślinnych białek HSL. W dalszej części omawianego rozdziału Autorka przedstawia wyniki analiz histologicznych „strefy odcinania” (nieaktywnej i aktywnej) kwiatów łubinu żółtego. Przedstawia również ekspresję genu *LIIDL* w nieaktywnej i aktywnej (ekspresja wielokrotnie zwiększona) „strefie odcinania” tych kwiatów. Kolejno przedstawione są wyniki wpływu modulatorów odcinania (etylenu i kwasu abscysynowego oraz ich inhibitorów) na aktywację „strefy odcinana” oraz na poziom ekspresji *LIIDL* po podaniu tych modulatorów. Kolejno Autorka omawia wpływ syntetycznego peptydu EPIP na utrzymywanie się kwiatów oraz przemiany histologiczne, biochemiczne, hormonalne i molekularne zachodzące w „strefie odcinania”. W ostatniej części omawianego rozdziału Autorka przedstawia wpływ suszy glebowej na odcinanie kwiatów łubinu żółtego. Przeanalizowane są parametry biometryczne roślin poddanych działaniu suszy (liczba liści, wilgotność liści i kwiatów, stopień aborcji kwiatów, zawartość mikro- i makro-elementów) oraz wykonana jest analiza histologiczna „strefy odcinania” kwiatów. Omówione są także przemiany hormonalne zachodzące pod wpływem suszy. Przedstawione zostały zmiany w ekspresji genów związanych biosyntezą kwasu abscysynowego (ABA) i etylenu. Przedstawiono również zmiany poziomu ABA oraz ACC (prekursora etylenu) w „strefie odcinania” pod wpływem suszy. Przedstawione są także wyniki testów immunocytochemicznych pokazujące lokalizację ABA i ACC w komórkach „strefy odcinania”. Dodatkowo przedstawiono zmiany w ekspresji genów *LIIDL*, *LIHSL* i *LIMP6* w „strefie odcinającej” kwiatów pod wpływem suszy. Przedstawiona jest również tkankowa i komórkowa lokalizacja kinazy białkowej MPK6 oraz katalazy (podane są dodatkowo dane dotyczące jej aktywności) w „strefie odcinającej” kwiatów łubinu żółtego rosnących w warunkach suszy glebowej.

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

Dyskusję uzyskanych wyników Autorka przeprowadziła na 21 stronach maszynopisu. Jest to bardzo długa dyskusja, dłuższa niż zazwyczaj spotykana w tego typu pracach. Obszerność dyskusji uzasadnia jednak złożoność problemu. Zarówno kontrola tworzenia jak i aktywacji „strefy odcinania” 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 **9 punktów** oraz **wniosku końcowego**, które dobrze oddają najważniejsze stwierdzenia wynikające z przeprowadzonych badań.

W recenzowanej pracy występują tzw. „literówki” oraz drobne błędy stylistyczne. Ich ilość jest jednak stosunkowo mała w porównaniu do większości tego typu prac. Te drobne uchybienia nie mają jednak znaczącego wpływu na poprawność językową pracy, jako całości.

Reasumując uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Panek stanowi ważny wkład w poznawanie mechanizmów prowadzących do odcinania 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 Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Panek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Antoni Banaś

prof. dr hab. Antoni Banaś