

Poznań, 31.05.2019 r.

Prof. dr hab. Iwona Morkunas  
Katedra Fizjologii Roślin  
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
ul. Wołyńska 35  
60-637 Poznań

**Ocena pracy doktorskiej mgr Katarzyny Panek**  
**pt. „Mechanizmy aktywujące strefę odcinania kwiatów**  
**lubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) oraz ich funkcjonowanie**  
**w warunkach suszy glebowej”**

Praca doktorska mgr Katarzyny Panek zrealizowana została w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Emilii Wilmowicz. Należy zaznaczyć, że część wyników badań prezentowanych w dysertacji jak podaje Doktorantka jest efektem realizacji dwóch zadań w ramach programów wieloletnich finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w latach 2011-2015 i 2016-2020. Doktorantka współuczestniczyła w realizacji zadania, które dotyczyło fizjologicznej i genetycznej kontroli rozwoju kwiatów i owoców u roślin strączkowych oraz w realizacji zadania, którego celem była identyfikacja genów warunkujących zawartość alkaloidów oraz zawiązywanie i utrzymanie organów generatywnych u łubinów. Podjęta przez Doktorantkę problematyka jest kontynuacją badań prowadzonych wcześniej przez Panią promotor dr hab. Emilię Wilmowicz w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, która była wykonawcą w powyższych projektach, pierwszym pt. „Ulepszanie krajowych źródeł białka roślinnego, ich produkcji, systemu obrotu i wykorzystania w paszach” i drugim pt. „Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju”. Dodatkowo należy wspomnieć, że wyniki badań wchodzące w skład dysertacji były częściowo finansowane z projektu MINIATURA 2 pt. „EPIP – kluczowy element molekularnego szlaku regulującego odcinanie kwiatów u lubinu żółtego”, którego kierownikiem jest Pani Promotor. Dodatkowo w finansowaniu tej pracy uczestniczyła także częściowo firma Cargill Poland Sp. z o.o.. W mojej opinii zakres finansowania tych badań był bardzo szeroki biorąc pod uwagę wymienione przez Doktorantkę źródła finansowania.

## **Struktura pracy – ocena formalna**

Recenzowana praca składa się z 162 stron, 33 rycin, 27 fotografii i 379 pozycji literaturowych. Pracę napisano według struktury właściwej dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych dyscyplinie nauk biologicznych. Rozpoczyna ją wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w pracy (1.5 strony), po czym Autorka przedstawia Streszczenie w języku polskim (1 strona) i angielskim (1 strona), Wstęp (22 strony), Cel pracy (2 strony), Materiał i metody (35 stron), Wyniki (50 stron), Dyskusja (21 stron), Podsumowanie wyników i wniosek (1 strona), Spis literatury (obejmuje 379 cytowanych artykułów literatury światowej, w zdecydowanej większości opublikowanych w latach 2001-2016).

**Wstęp dysertacji** jest napisany syntetycznie i jak już wcześniej wspomniałam obejmuje 22 strony, zawiera 5 rycin i 1 tabelę, przy czym Doktorantka dzieli ten rozdział na 3 główne podrozdziały, przeprowadzające czytelnika przez kwestie dotyczące procesu separacji organów, następnie strefy odcinania i informacje dotyczące stresu spowodowanego niedoborem wody. W drugim podrozdziale, zatytułowanym „Strefa odcinania”, Doktorantka przedstawia kolejne podrozdziały, cytuję „3.2.1. Funkcjonowanie 3.2.1.1. Przemiany biochemiczne 3.2.1.2. Kontrola genetyczna 3.2.1.3. Kontrola hormonalna 3.2.1.3.1. Kwas abscysynowy, 3.2.1.3.1.1. Biosynteza 3.2.1.3.1.2. Rola w odcinaniu organów 3.2.1.3.2. Etylen 3.2.1.3.2.1. Szlak biosyntezy 3.2.1.3.2.2. Udział w separacji organów”. Uważam, że tytuły tych podrozdziałów są napisane zbyt ogólnie i powinny być tak sformułowane, aby wskazać czytającemu kontekst, w jakim tekst podrozdziału został napisany. Podobna uwaga do tytułu podrozdziału trzeciego zatytułowanego „Stres spowodowany niedoborem wody”, który powinien być ukierunkowany, tj. powinien dotyczyć wpływu deficytu wody na odcinanie organów. Ponadto pożądanym byłoby, aby wstęp rozprawy doktorskiej zawierał większą liczbę schematów lub rycin, szczególnie w podrozdziałach zatytułowanych „Proces separacji organów” i „Strefa odcinania”, ponieważ w publikowanej literaturze są przedstawione ryciny i zdjęcia z mikroskopu elektronowego i świetlnego przedstawiające warstwę odcinania kwiatów dla innych gatunków roślin niż obiekt będący przedmiotem badań tej pracy.

Jednak chciałabym podkreślić, że poza powyżej wymienionymi uwagami, rozdział Wstęp napisany przez Panią mgr Katarzynę Panek zawiera cenne informacje dotyczące powstawania i różnicowania strefy odcinania kwiatów oraz mechanizmów regulujących ten proces i stanowi wartościowe opracowanie przygotowane w oparciu o przegląd literatury w przedstawianym zakresie. Dla przykładu, w rozdziale dotyczącym „Separacji organów”, Doktorantka podnosi z jednej strony znaczenie tego procesu jako wysoce skoordynowanego,

zaprogramowanego genetycznie warunkującego prawidłowy przebieg ontogenezy, z drugiej strony jako procesu mającego na celu wyeliminowanie starzejących się organów, których utrzymywanie na roślinie generuje duże straty energetyczne, a także jako mechanizmu obronnego, umożliwiającego dostosowanie się roślin do zmieniających warunków środowiska. Ponadto zostały omówione czynniki warunkujące różnicowanie strefy odcinania (AZ, ang. *abscission zone*) poszczególnych organów. Doktorantka przeanalizowała literaturę z ostatnich dwudziestu lat przedstawiając geny i czynniki transkrypcyjne regulujące powstawanie AZ. Ponadto cennym jest także zestawienie przez Nią w Tabeli 1, podrozdział 3.2.1 wybranych genów kodujących enzymy hydrolityczne modyfikujące ściany komórkowe w AZ, pokazując miejsce ekspresji u różnych gatunków roślin. W mojej opinii najlepiej opisanym zagadnieniem we Wstępie jest udział hormonów w aktywacji strefy odcinania kwiatów i samego procesu odcinania tych organów.

**Nadrzędny cel i cele cząstkowe pracy** zostały przez Doktorantkę jasno sformułowane na stronach 34-35 rozprawy. Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była identyfikacja nowych elementów szlaku regulującego funkcjonowanie strefy odcinania kwiatu (AZ) u łubinu żółtego i określenie udziału tych elementów w wywołanym stresem suszy glebowej odcinaniu kwiatów. Ponadto zbadano także wpływ deficytu wody na przemiany biochemiczne i molekularne zachodzące w strefie odcinania kwiatu. Cel nadrzędny został osiągnięty poprzez realizację celów cząstkowych, którymi były, cytując:

- zidentyfikowanie i charakterystyka sekwencji cDNA genu *LIIDL* (*INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION-like*), zbadanie jego ekspresji podczas funkcjonowania AZ kwiatów, a także po aplikacji ABA lub ET oraz inhibitorów ich biosyntezy i działania;
- analiza zmian strukturalnych zachodzących w AZ pod wpływem egzogennego ABA i ET oraz sztucznej aktywacji wywołanej odcięciem kwiatu u jego nasady;
- zbadanie wpływu syntetycznego peptydu EPIP uzyskanego na podstawie przewidywanej sekwencji aminokwasowej *LIIDL* na stopień aborcji kwiatów, zmiany histologiczne zachodzące w AZ, szlak biosyntezy ABA i ET poprzez określenie wzorca ekspresji genów kodujących syntazę (*LIACS*) i oksydazę (*LIACO*) ACC, epoksydazę zeaksantyny (*LIZEP*) oraz lokalizację ABA i ACC – prekursora ET, poziomu mRNA nowo zidentyfikowanych genów *LIHSL* i *LIMPK6*, które kodują odpowiednio kinazę receptorową oraz aktywowaną mitogenem kinazę zaangażowaną w kaskadę sygnalizacyjną kinaz *MAP*, immunolokalizację i aktywność katalazy (*CAT*), powstanie fosfoprotein.

Ponadto jednym z celów czastkowych było także „określenie wpływu suszy glebowej na liczbę liści wytworzonych przez roślinę, powierzchnię liści, maksymalną wydajność kwantową fotosystemu II ( $F_v/F_m$ ), wilgotność liści i AZ, poziom makroelementów w liściach i stopień aborcji kwiatów, zmiany strukturalne zachodzące w AZ, profil aktywności transkrypcyjnej genów *LIIDL*, *LIHSL*, *LIMPK6*, *LIZEP*, *LIACS* i *LIACO*, poziom i lokalizację komórkową *ABA* i *ACC* oraz występowanie w AZ *MPK6* oraz lokalizację i aktywność *CAT*.”

Temat i cel ocenianej pracy doktorskiej dotyczą, w moim przekonaniu, niezwykle ważnego procesu regulowanego genetycznie, który pozwala roślinie na realizację określonego programu rozwojowego. Mogę też stwierdzić, że zarówno temat pracy doktorskiej jak i kierunkowy cel są jasno sformułowane przez mgr Katarzynę Panek i spełniają wymagania stawiane obecnie przed Autorami ważnych projektów badawczych. Dodatkowo mechanizmy dotyczące regulacji odcinania kwiatów u łubinu żółtego stanowią od wielu lat przedmiot szczególnych zainteresowań naukowców z Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zatem wyniki badań Pani mgr Katarzyny Panek wnoszą nowe elementy i poszerzają wiedzę w powyższym w zakresie.

### **Materiał i Metody**

Jak już wyżej wspomniałam obiektem badań niniejszej dysertacji był łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) odmiany epigonalnej Taper, który jak Doktorantka uzasadnia charakteryzuje się krótszym niż formy tradycyjne okresem rozwoju wegetatywnego, wysoką równomiernością dojrzewania, wyższym współczynnikiem plonowania oraz niskimi wymaganiami glebowymi. W rozdziale 5. Materiały i metody, podrozdział 5.1. Materiały i 5.1.1. Materiał roślinny, Doktorantka donosi, że nasiona traktowano przez dobę środkiem przeciwgrzybowym Sarfun T 65 DS (250ml/100kg nasion), a następnie szczepiono Nitraginą (3g/1kg nasion) zawierającą szczep *Bradyrhizobium lupini*. Autorka wymieniając warianty doświadczalne nie napisała, czy badała wpływ tych preparatów na rozwój i status metaboliczny strefy odcinania kwiatu (AZ) w łubinie żółtym. W mojej opinii istotnym byłoby porównanie materiału kontrolnego i materiału traktowanego tymi preparatami i ich wpływ na wykształcenie strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego.

Poza powyższymi uwagami rozdział Materiał i metody został napisany w sposób pozwalający wysoko ocenić kompetencje Doktorantki, zarówno w prawidłowym doborze stosowanych metod jak i ich zastosowaniu. Należy podkreślić, że zrealizowanie celu pracy było możliwe dzięki opanowaniu przez Nią bardzo szerokiego wachlarza technik badawczych, tj. od pracy z

materiałem biologicznym, poprzez prace z zakresu biologii molekularnej obejmujące analizy kwasów nukleinowych i białek, a także zastosowanie metod biochemicznych i mikroskopowych. Z pewnością opanowanie przez Doktorantkę różnych technik wymagało wielogodzinnej pracy w laboratorium. Opisy wykorzystanych metod na stronach 36-70 obrazują z jednej strony skalę trudności, a z drugiej strony wiedzę i biegłość warsztatową Doktorantki oraz wkład Jej pracy laboratoryjnej w otrzymanie wyników do pracy doktorskiej. Stosowane metody zostały szczegółowo opisane przez Doktorantkę. Jednak mam kilka uwag dotyczących opisów przeprowadzonych doświadczeń:

- Str. 53 Fot.3 Autorka pokazuje obraz elektroforetyczny reprezentatywnych próbek całkowitego RNA rozdzielanych w żelu agarozowym, każda ścieżka zawierała taką samą ilość RNA (około 5 µg), a mimo to intensywności rRNA są różne. Czy ilości całkowitego RNA użyte do odwrotnej transkrypcji przeliczano z pomiaru stężenia na Nano Dropie, czy też wykonano dokładniejsze pomiary stężeń np. na Qubicie. Przed reakcją odwrotnej transkrypcji powinna być wykonana również analiza jakościowa wyizolowanego RNA uwzględniająca udział poszczególnych rRNA w próbach, a także powinna być sprawdzona obecność genomowego DNA w badanych RNA. Autorka w swojej pracy o tym nie wspomina.

Ponadto Doktorantka nie ustrzegła się od użycia określeń pochodzących z żargonu laboratoryjnego:

- np. fragmenty namnażane, powinno być raczej fragmenty amplifikowane albo powielane
- sekwencje wysoce zachowywane, powinno być raczej sekwencje konserwatywne albo sekwencje zachowawcze

## **Wyniki**

Na ponad 50 stronach rozprawy Doktorantka szczegółowo przedstawia rezultaty dokonanych przez siebie analiz z wykorzystaniem nowoczesnych metod molekularnych i biochemicznych. Nie sposób w zwięzłej recenzji przedstawić i skomentować wszystkie uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Najważniejszymi osiągnięciami tej pracy są:

- zidentyfikowanie sekwencji cDNA genów kodujących potencjalny ligand i receptor uczestniczących w szlaku aktywującym strefę odcinania kwiatów u łubinu żółtego
- wykazanie poprzez porównawcze analizy bioinformatyczne, że sekwencje zidentyfikowanych genów są homologiczne do tych, które kodują IDL, HSL i MPK6 u innych gatunków roślin
- udokumentowanie, że egzogeny etylen (ET), kwas abscysynowy (ABA) i sztuczna aktywacja strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego skutkują przemianami na poziomie komórkowym podobnymi do tych, które występują w naturalnie aktywnej strukturze

- udowodniono, że syntetyczny peptyd EPIP, uzyskany na podstawie przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIIDL, aktywuje strefę odcinania kwiatów i zwiększa stopień ich aborcji. Poza tym stwierdzono, że egzogenny EPIP zwiększa aktywność transkrypcyjną genów zaangażowanych w biosyntezę hormonalnych stymulatorów odcinania kwiatów, tj. ABA (LIZEP) i etylenu (LIACS i LIACO) oraz podnosi ich endogenny poziom i wpływa na specyficzną lokalizację w komórkach strefy odcinania. Dodatkowo wykazano, że peptyd EPIP stymuluje ekspresję genów LIHSL i LIMP6, a także prowadzi do wzrostu poziomu fosfoprotein regulujących aktywację strefy odcinania

- przedstawiono, że stres suszy glebowej aktywuje komórki AZ kwiatów i podnosi aktywność transkrypcyjną genów LIIDL, LIHSL, LIMP6 oraz tych, zaangażowanych w powstawanie ABA (LIZEP) i ET (LIACO, LIACS). Ponadto wpływa także na lokalizację katalazy w komórkach

Przedstawione powyżej osiągnięcia naukowe pokazują ogrom pracy jaki musiała włożyć Doktorantka, aby opanować techniki badawcze i otrzymać wyniki badań.

Jednak mam także kilka uwag dotyczących przedstawienia wyników:

- Doktorantka na Fot. 16., str 98 pokazuje aktywność katalazy (CAT) w strefie odcinania (AZ) kwiatów łubinu żółtego po aplikacji syntetycznego peptydu EPIP. Uważam, że elektroforezę natywną dla CAT należałoby prowadzić dłużej, aby białko mogło dobrze wejść w żel

- Wszystkie przedstawione w pracy obrazy kwasów nukleinowych po elektroforezie są mało czytelne, Fot. 4 str 71 produkt w ścieżce 4, natomiast ścieżki 1, 2, 3 nie są opisane

- Fot. 5 str 72 ścieżka 1 - widoczny jest 1 fragment, gdzie pozostałe formy plazmidu ?

- Ścieżka 3, użyty wektor ma wielkość ponad 4000 pz, z tej fotografii to nie wynika, analogiczna sytuacja na fotografii 7 str 73. Wszystkie pokazane w pracy rozdziały elektroforetyczne prowadzono zbyt krótko, ponadto do rozdzielania małych fragmentów użyto 1% agarozy, a zwykle małe fragmenty wymagają większego stężenia agarozy np. 2%

- Str. 76 rozdział 6.1.1.2 jest: fragmenty transkryptów HSL „u łubinu żółtego” powinno być raczej w łubinie żółtym

- Str. 100 na Fot. 100 jest obraz żelu wybarwionego Coomassie, a nie jak Autorka pisze membrany

- Fot. 20 jest mało czytelna, co oznaczają strzałki po prawej stronie fotografii? Co Autorka miała na myśli?

- W pracy pokazano po 1 sekwencji genów LIIDL, LIHSL i LIMPK6 z łubinu, moje pytanie: czy w łubinie występują te geny jako pojedyncze geny, czy też występują tutaj rodziny wielogenowe? Jeżeli występują rodziny wielogenowe to ich przedstawiciele mogą ulegać

różnej ekspresji. Dlaczego do badania ekspresji powyższych genów wybrano tylko pojedyncze sekwencje nukleotydowe?

- Jako gen referencyjny wybrano tylko aktywną, czy testowano inne geny ulegające konstytutywnej ekspresji?

### **Dyskusja**

Dyskusja jest jednym z najlepiej napisanych rozdziałów w tej dysertacji, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Prawdziwym sprawdzianem dla każdego doktoranta jest omówienie wyników własnych badań na tle prac badawczych prowadzonych przez inne zespoły. Dyskusja jest bogata i wielokierunkowa, zasługuje na pozytywną ocenę.

### **Wnioski końcowe**

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Katarzyny Panek, w tym szczególnie oryginalnej wartości naukowej, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymagania Ustawy, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora i z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Mikoła Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Katarzyny Panek do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę ogrom pracy jaki musiała Doktorantka włożyć w otrzymanie wyników badań i mając na względzie wykorzystanie wielu metod badawczych, które pokazują Jej biegłość warsztatową wnioskuję o wyróżnienie pracy.

*I. Morkunas*

---

Prof. dr hab. Iwona Morkunas