



Uniwersytet Warszawski

Wydział Biologii



Dr hab. Marta Koblowska, prof. UW
Kierownik Zakładu Biologii Systemów
Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin
Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 01.09.2017

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pani mgr Agaty Kućko

"Charakterystyka strefy odcinania kwiatów łubinu Żółtego (*LUPINUS LUTEUS L.*) oraz udziału kwasu abscysynowego i etylenu w jej funkcjonowaniu"

wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

po kierunkiem dr hab. Jacka Kęsy oraz dr hab. Emilii Wilmowicz (promotor pomocniczy)

Na realizację programów rozwojowych w tym odrzucanie organów u roślin mają wpływ czynniki endogenne takie jak aktywność genów regulatorowych i działanie fitohormonów, a także zmieniające się warunki środowiskowe. Odrzucanie organów to precyzyjnie kontrolowany proces istotny zarówno dla stadium rozwoju wegetatywnego, jak i generatywnego. Wiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych regulujących odrzucaniem organów kwiatowych u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* czy kwiatów i owoców u pomidora. Zdobyta dotąd wiedza oparta na badaniach różnych gatunków roślin wskazuje jednak, że proces odrzucania organów jest nie tylko wysoce skomplikowany lecz także odmienne gatunki roślin często mają odrębne sposoby jego regulacji.

Rozprawa doktorska pani mgr Agaty Kućko została poświęcona analizie mechanizmu odcinania kwiatów u łubinu żółtego. Doktorantka wybrała do badań ten gatunek, ponieważ ma on duże znaczenie gospodarcze w Polsce. Łubin żółty z rodziny bobowatych (Fabaceae) ze względu na wysoką jakość nasion zawierających dużo białka, a mało substancji antyżywnościowych na przykład alkaloidów stanowi doskonałe źródło paszy dla zwierząt monogastrycznych. Roślina ta mogłaby mieć zdecydowanie wyższy potencjał plonotwórczy gdyby nie zjawisko zbyt wczesnego i nadmiernego odcinania kwiatów. Identyfikacja elementów istotnych dla regulacji tego procesu, charakterystycznych dla łubinu żółtego daje szansę w przyszłości na zahamowanie tego zjawiska lub przynajmniej zmniejszenie liczby odcinanych kwiatów, a tym samym zwiększenie znaczenia gospodarczego badanego gatunku.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona mi do recenzji praca liczy 209 stron i jest przygotowana w sposób klasyczny, zawiera wszystkie niezbędne dla pracy dyplomowej elementy. Rozpoczyna ją zwięzłe streszczenie w języku polskim i angielskim, źródła finansowania oraz spis treści i używanych skrótów. Jednostronicowe streszczenie zawiera najważniejszy cel badawczy oraz wnioski wynikające z uzyskanych w trakcie doktoratu danych. Obszerny wstęp i podrozdział obejmujący cele badawcze poprzedzają części zawierające opis wykorzystanych w pracy materiałów i metod badawczych oraz wyniki. Po szerokiej dyskusji, znajduje się rozdział ze zwięzłym podsumowaniem wyników wraz ze szczegółowymi wnioskami. Na końcu pracy umieszczony jest spis literatury oraz rycin, fotografii i tabel. Dłuższe części pracy dyplomowej podzielone są na liczne podrozdziały i mieszczą w sobie przejrzyste ryciny i tabele. Praca jest obszernie napisana.

Ocena merytoryczna

Doktorantka rozpoczyna **Wstęp** od przedstawienia elementów istotnych dla regulacji odcinania organów. Zalicza do nich czynniki takie jak deficyt asymilatów, nieprawidłowy proces zapylenia lub zapłodnienia kwiatów, oraz stresi biotyczne (atak patogenu) i abiotyczne. Prezentuje dane wskazujące na różny wpływ wymienionych czynników u odrębnych gatunków roślin i zaznacza z kluczową rolą regulacji fitohormonalnej w procesie odcinania organów, a także przedstawia model odcinania organów u roślin. W dalszej części wstępu Doktorantka bardzo szczegółowo analizuje przemiany genetyczne, molekularne i biochemiczne, związane na przykład z różnicowaniem strefy odcinania czy remodelowaniem ściany komórkowej. Wyczerpująco zapoznaje ze znaczeniem i szlakami biosyntezy wybranych fitohormonów, etylenu i kwasu abscysynowego, które są ważne dla procesu separacji organów u roślin. Doktorantka w tej części pracy, krótko wspomina o znaczeniu programowanej śmierci komórkowej w procesie odcinania organów. Więcej informacji na ten temat mgr Agata Kućko umieściła w dyskusji wyników. W mojej ocenie najważniejszym przestaniem tej części pracy jest wskazanie, że dotychczas nie zidentyfikowano uniwersalnej ścieżki regulatorowej podstawowej dla odcinania organów u różnych gatunków roślin. Czy tak jest rzeczywiście? Niektórzy naukowcy jako wspólny mechanizm dla regulacji tego procesu u wielu odrębnych gatunków roślin wskazują szlak sygnałowy IDA-HAE/HSL2, opisany przez Doktorantkę we wstępie pracy. Chciałabym poznać opinię pani mgr Agaty Kućko na ten temat. Czy znane są elementy tej ścieżki regulatorowej u łubinu żółtego?

Wstęp został napisany w sposób bardzo szczegółowy, w mojej ocenie nieco wyższy poziom ogólności poprawiłby odbiór tekstu i pozwolił na łatwiejsze zrozumienie zjawisk związanych z separacją organów u roślin. Zamieszczone we wstępie ryciny nie zostały opatrzone nawet krótkimi opisami, czytelnik jest zmuszony do poszukiwania objaśnień w tekście, co dodatkowo utrudnia jego odbiór. Pewnym utrudnieniem jest także stosowanie przez mgr Agatę Kućko w całym tekście rozprawy bardzo wielu skrótów co prowadzi do powstawania często zagadkowych zdań. Mimo tych uwag chcę zaznaczyć, że wstęp zawiera potrzebne informacje i wprowadza czytelnika w tematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę.

Cel pracy jest przejrzysto sformułowany, obejmuje szeroką charakterystykę struktury strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego, analizę zjawisk molekularnych i biochemicznych, które towarzyszą temu procesowi oraz zbadanie znaczenia dwóch fitohormonów: kwasu abscysynowego i etylenu w regulacji zjawiska separacji kwiatów u łubinu żółtego. Precyzyjnie wyszczególnione zadania wskazują na dokładne przemyślenie i opracowanie planu działania.

Do realizacji wytyczonych celów Doktorantka wykorzystwała szeroką gamę technik - od mikroskopii, przez biologię molekularną i techniki biochemiczne, które opisała w podrozdziale **Materiały i Metody**. Przedstawione opisy są przejrzyste i zrozumiałe.

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej pokazują, że zamierzone cele zostały w pełni zrealizowane. Wykorzystując techniki mikroskopowe Doktorantka z sukcesem zidentyfikowała miejsce, czas powstawania i aktywacji strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego. Wykorzystując techniki mikroskopii elektronowej scharakteryzowała ultrastrukturę komórek budujących tę strefę. Zrealizowanie tego celu pozwoliło w dalszej części pracy na precyzyjne dobieranie fragmentów do analiz molekularnych i biochemicznych, co stanowi dużą zaletę prezentowanych wyników.

Badania nad innymi gatunkami roślin pokazują, że w procesie odcinania organów od rośliny macierzystej silnej aktywacji podlegają zarówno enzymy o aktywności hydrolitycznej, jak i modyfikujące ścianę komórkową. Używając technik mikroskopowych oraz biochemicznych analiz Doktorantka wykazała, że podobne zjawiska zachodzą podczas odcinania kwiatów łubinu żółtego. Doktorantka scharakteryzowała szereg zmian zachodzących w błonach i ścianach komórkowych komórek budujących strefę odcinania kwiatów. Stosując różne podejścia eksperymentalne Doktorantka udowodniła, że u łubinu żółtego w aktywnej strefie odcinania kwiatów następuje rozluźnienie struktury ściany komórkowej oraz jej remodelowanie, i co istotne przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że procesy te zależą od działania etylenu i kwasu abscysynowego. Kolejnym elementem związanym z odcinaniem organów u roślin jest nagromadzenie w obszarze aktywnej strefy odcinania reaktywnych form tlenu i programowana śmierć komórkowa. Wykonane przez Doktorantkę eksperymenty jasno wykazały, że także u łubinu żółtego separacja kwiatów wiąże się z zachodzeniem tych zjawisk. Co więcej, jak prezentuje Doktorantka zmiany poziomu i aktywności enzymu peroksydazy, który jest zaangażowany w regulację poziomu reaktywnych form tlenu były stymulowane działaniem egzogenego kwasu abscysynowego i etylenu.

Odcinanie kwiatów u roślin zależy od uruchomienia programu różnicowania komórek strefy odcinania sterowanego przez specyficzne czynniki transkrypcyjne. Jednym ze znanych czynników transkrypcyjnych kluczowych dla tego procesu jest białko *BLADE-ON-PETIOLE (BOP)*. Mgr Agata Kućko zidentyfikowała u łubinu żółtego cDNA homologa genu kodującego czynnik BOP (*LIBOB*) i wykazała, że podniesienie jego poziomu transkrypcji koreluje z powstawaniem aktywnej strefy odcinania. Dodatkowo dane uzyskane przez mgr Agatę Kućko pokazują, że aktywność transkrypcyjna *LIBOB* podlega stymulacji przez fitohormony zaangażowane w odcinanie kwiatów u roślin - kwas abscysynowy i etylen.

Kolejnym osiągnięciem Doktorantki są wyniki uzyskane w trakcie badań nad hormonalną kontrolą strefy odcinania kwiatów łubinu żółtego. Ta część pracy najbardziej mi się podoba - to seria spójnych eksperymentów, które prowadzą do ustalenia zależności pomiędzy działaniem kwasu abscysynowego i etylenu oraz ich wpływu na stopień odcinania kwiatów u łubinu żółtego. Doktorantka wykazała, że badane przez nią hormony - etylen i kwas abscysynowy zwiększają stopień aborcji kwiatów, przy czym etylen wykazuje silniejsze działanie od ABA. Przy braku etylenu egzogeny kwas abscysynowy nie zwiększa liczby odcinanych kwiatów. Kolejnym etapem było ustalenie wpływu ABA na poziom ekspresji genów biosyntezy etylenu. W tym celu mgr Agata Kućko sklonowała cDNA homologów dwóch genów kodujących kluczowe enzymy w ścieżce biosyntezy etylenu: syntazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC) prekursora etylenu i oksydazy ACC. Doktorantka jednoznacznie wykazała, że kwas abscysynowy stymuluje ich aktywność transkrypcyjną. Zbadła także poziom transkrypcji zidentyfikowanych genów w trakcie powstawania i aktywacji strefy odcinania, wykazała pozytywną korelację pomiędzy tymi zjawiskami. Kolejnym pytaniem było czy zwiększony poziom ekspresji genów biosyntezy etylenu rzeczywiście zwiększa poziom hormonu w komórkach aktywnej strefy odcinania. Doktorantka odkryła, że ABA powoduje akumulację prekursora etylenu - kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC) w aktywnej strefie odcinania kwiatów. Jednocześnie udokumentowała, że poziom endogenego ABA zwiększa się w komórkach

analizowanego obszaru. Wyniki te wskazują na współdziałanie badanych fitohormonów w regulacji odcinania kwiatów u łubinu żółtego. Dodatkowo mgr Agata Kućko wskazała na prawdopodobne funkcjonowanie pętli zwrotnej, polegającej na stymulowaniu przez etylen jego własnej biosyntezy.

Podsumowując ocenę merytoryczną wyników Doktorantka klarownie opisuje oryginalne dane i przekonująco dokumentuje swoje osiągnięcia. Eksperymenty zostały wykonane prawidłowo.

W podrozdziale **Dyskusja** mgr Agata Kućko dokładnie omawia najistotniejsze wyniki, ta część pracy podobnie jak jej Wstęp jednoznacznie wskazują na bardzo dobrą znajomość literatury w obszarze podjętej tematyki badawczej. Warto podkreślić, że w tej części pracy pani Agata Kućko w oparciu o otrzymane przez siebie dane zaproponowała hipotetyczny model odcinania kwiatów u łubinu żółtego, który bardzo elegancko podsumowuje istotne osiągnięcia Doktorantki.

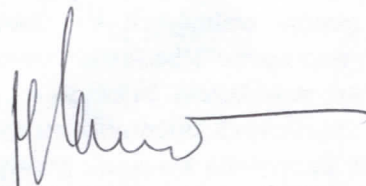
W mojej ocenie rozdział **Podsumowanie Wyników i Wnioski Szczegółowe** to bardzo ważna część pracy. W tej części w sposób jasny i klarowny Doktorantka wylicza swoje osiągnięcia, oryginalność wyników i najważniejsze wnioski. Pozwala to jeszcze bardziej docenić wkład mgr Agaty Kućko w badania nad separacją kwiatów u roślin i regulację tego procesu przez fitohormony.

Ciekawi mnie jak Doktorantka widzi zastosowania swoich badań w poprawie plonowania łubinu żółtego. Czy potrzebne są, a jeśli to jakiego typu badania aby wykorzystać zdobytą wiedzę w poprawie upraw łubinu żółtego?

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Agaty Kućko została poświęcona istotnemu zagadnieniu jakim jest separacja kwiatów u łubinu żółtego. Problem regulacji odcinaniem kwiatów u roślin jest ważny nie tylko w zakresie poznawczym, ale może mieć także znaczenie dla gospodarki człowieka. Aby poznać mechanizmy kierujące tym procesem u łubinu żółtego Doktorantka wykorzystwała szereg różnorodnych technik badawczych. Wykonane eksperymenty były dobrze przemyślane, a wartościowe wyniki zostały przedstawione w sposób bardzo staranny. Doktorantka zidentyfikowała cDNA czterech genów - genu czynnika transkrypcyjnego LIBOB, dwóch genów: *LIACS* i *LIACO* kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę etylenu - syntazę ACC oraz oksydazę ACC oraz genu kodującego enzym epoksydazę zeaksantyny LIZEP ważną w biosyntezie kwasu abscysynowego. Sekwencje zostały zdeponowane w banku genów NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Część wyników uzyskanych przez Doktorantkę została opublikowana w dwóch bardzo dobrych publikacjach naukowych w czasopiśmie o wysokim współczynniku wpływu - *Journal of Plant Physiology*. Mgr Agata Kućko jest współautorką wspomnianych prac.

Recenzowana przeze mnie praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, o których mówi artykuł 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. z 2003 r. nr 65, poz. 595; ze zm. w Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455). W związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Agaty Kućko do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje także o wyróżnienie tej pracy stosowną nagrodą.



Dr hab. Marta Kobłowska, prof. UW