

dr hab. inż. Edyta Skrzypek, prof. IFR PAN  
Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego  
Polskiej Akademii Nauk  
Zakład Biotechnologii  
ul. Niezapominajek 21  
30-239 Kraków

### Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana mgr Mariusza Banacha pt. „Wpływ temperatury oraz egzogennie podawanych hormonów na ekspresję genów szlaku autonomicznego u *Lupinus luteus*” wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, pod kierunkiem dr hab. Jacka Kęsy i dr Waldemara Wojciechowskiego

Rozprawa doktorska mgr Mariusza Banacha dotyczy określenia wpływu temperatury oraz wybranych hormonów na ekspresję genów szlaku autonomicznego kontrolujących kwitnienie u łubinu żółtego.

Kwitnienie jest złożonym procesem morfogenetycznym i fizjologicznym, warunkowanym przez szereg czynników wewnętrznych i środowiskowych. Przejście roślin z fazy wegetatywnej do generatywnej jest konsekwencją wielu skomplikowanych reakcji zachodzących wieloetapowo. W ostatnich latach dokonano znaczącego postępu prowadzącego do poznania molekularnych mechanizmów indukcji kwitnienia roślin. Jednak większość badań mająca na celu wyjaśnienie mechanizmów kontrolujących proces kwitnienia dotyczy głównie fakultatywnej rośliny dnia długiego, rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*).

Dużą zaletą podjętego przez mgr Mariusza Banacha problemu badawczego jest nie tylko jego aspekt poznawczy ale i praktyczny. Wśród gatunków roślin bobowatych uprawianych obecnie w Polsce największe znaczenie gospodarcze obok grochu siewnego i bobiku ma łubin żółty, co wynika z wykorzystywania go przez całe dziesięciolecia w żywieniu zwierząt, głównie w celu podwyższenia koncentracji białka w paszy. Rodzime nasiona łubinu

powinny się stać alternatywą dla sprowadzanej z Europy Zachodniej i Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej genetycznie modyfikowanej soi, ze względu na dużą zawartość białka, porównywalną lub nawet wyższą od ilości białka w nasionach soi niemodyfikowanej, oraz dwukrotnie większą zawartością cysteiny i metioniny. Mieszanek nasion łubinu z innymi bobowatymi np. grochem i bobikiem może służyć również do produkcji ekstraktów białkowych lub prebiotyków. Ze względu na fitosanitarną i fitomelioracyjną rolę oraz "oszczędne" gospodarowanie azotem w Polsce rośliny bobowate powinny stać się w przyszłości coraz ważniejszymi gospodarczo roślinami uprawnymi. Niestety, ich wrażliwość na warunki środowiska, skutkująca niestabilnością plonowania, czyni te rośliny mniej atrakcyjnymi w uprawie. Także trudności w kontroli zapylania, optymalizacji czasu kwitnienia, odpadania kwiatów i strąków oraz ograniczona pula genowa roślin będących w hodowli, prowadzi do spowolnienia postępu przy wyprowadzaniu i ulepszaniu nowych odmian.

Podsumowując powyższe stwierdzenia, uważam, że podjęcie badań mających na celu identyfikację sekwencji kodujących genów szlaku autonomicznego występujących u łubinu żółtego, charakterystykę przewidywanych sekwencji aminokwasowych i wzorców ich ekspresji oraz określenie wpływu temperatury i wybranych regulatorów wzrostu na aktywność transkrypcyjną genów autonomicznego szlaku indukcji kwitnienia jest wysoce uzasadnione.

### **Ocena i uwagi dotyczące poszczególnych rozdziałów**

Oceniana praca zawiera wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich oraz spełnia wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Obejmuje ona 152 strony druku, z czego tekst uzupełniają 53 ryciny i 15 tabel, które rzetelnie obrazują wykonane doświadczenia. W toku wywodu Autor cytuje 115 pozycji literatury. Recenzowana dysertacja została napisana starannie i przejrzysto.

Rozprawę doktorską otwiera spis treści, po którym Autor umieścił streszczenia w języku polskim i angielskim, a następnie bardzo szczegółowy „Wykaz stosowanych skrótów”. Autor wymienił ich 203.

We „Wstępie” liczącym 45 stron Autor zawarł przegląd literatury, wprowadzający czytelnika w problemy związane z przedmiotem pracy. Przegląd literatury został opracowany starannie i wnikliwie, uwzględniając najnowsze osiągnięcia mające znaczenie dla poznania mechanizmu kwitnienia. Autor omówił zagadnienia dotyczące ontogenezy roślin telomowych, percepcji sygnałów przez rośliny, indukcji kwitnienia z uwzględnieniem historii badań i

najważniejszych osiągnięć dotyczących prób identyfikacji czynników i regulacji procesu kwitnienia. Omówił najnowsze doniesienia literaturowe dotyczące szlaków indukcji kwitnienia związanych z fotoperiodem, jakością światła, wernalizacją, temperaturą otoczenia, hormonami, wiekiem (dojrzałością fizjologiczną) roślin oraz szlaku autonomicznego. Szlak autonomiczny opisał bardzo szczegółowo uwzględniając charakterystykę genów oraz właściwości strukturalne, funkcję i lokalizację komórkową białek indukcji kwitnienia. Doktorant podsumował informacje dotyczące szlaków indukcji kwitnienia obszernym opisem ich współdziałania, szczególnie na poziomie molekularnym oraz roli mikroRNA w rozwoju generatywnym roślin.

Ponieważ szlaki indukcji kwitnienia współdziałają na wielu poziomach, od molekularnego do morfologicznego, dlatego proszę Doktoranta o podjęcie próby krótkiego omówienia ich współdziałania u łubinu żółtego, na podstawie badań własnych i prowadzonych w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK.

W podrozdziale dotyczącym hormonalnego szlaku indukcji kwitnienia Doktorant skupił się na giberelinach z krótką wzmianką dotyczącą innych regulatorów wzrostu. W związku z tym, proszę Doktoranta o omówienie roli innych regulatorów wzrostu w procesie kwitnienia.

We wstępie Autor przedstawił również charakterystykę łubinu żółtego, jego uprawę oraz symbiozę z bakteriami wiążącymi azot.

Autor umiejętnie i jasno przedstawiła cel badań, którym była identyfikacja sekwencji kodujących genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego oraz charakterystyka sekwencji aminokwasowych i wzorców ich ekspresji w organach wegetatywnych. Analizowano także wpływ temperatury i hormonów roślinnych (ABA, GA<sub>3</sub>) na aktywność transkrypcyjną wybranych genów autonomicznego szlaku indukcji kwitnienia. Cel pracy koresponduje z tematem pracy, założeniami metodycznymi oraz wnioskami.

Materiał i metodyka badań, obejmujące 18 stron druku, są właściwie dobrane do celu pracy. Doktorant stosował jako materiał badawczy łubin żółty odmiany Taper. Identyfikację genów szlaku autonomicznego przeprowadził w materiale roślinnym pochodzącym z uprawy w kontrolowanych warunkach w komorze wegetacyjnej, a wpływ temperatury i hormonów roślinnych na aktywność transkrypcyjną genów w/w szlaku w roślinach uprawianych w naturalnych warunkach na poletkach doświadczalnych. Analizy prowadzono w trzech terminach (przed i po opryskach hormonami) w liściach dolnych i górnych, ogonkach liściowych oraz w wierzchołkach wzrostu roślin wysianych w różnych terminach.

Metody doświadczalne zostały opisane bardzo precyzyjnie, począwszy od warunków uprawy łubinu żółtego przeznaczonych do badań, poprzez szczegółowy opis metody izolacji RNA, reakcji odwrotnej transkrypcji, identyfikacji genów szlaku autonomicznego, techniki RACE PCR, RT-PCR, do wykazu odczynników i programów komputerowych użytych w doświadczeniach.

Uzyskane wyniki, obejmujące 40 stron, przedstawione są w sposób uporządkowany i jasny wykazując zrealizowanie założonego celu. Wykorzystując nowoczesne techniki badawcze mgr Mariusz Banach wykazał na podstawie analizy sekwencji kodujących homologów genów *FCA*, *FY*, *FLD*, *FPA*, *FVE*, *FLK* i *LD* oraz wzorców ich ekspresji występowanie i aktywność szlaku autonomicznego u łubinu żółtego. Doktorant wytypował za pomocą analiz bioinformatycznych przewidywane sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez w/w geny. Potwierdził też występowanie w obrębie sekwencji cDNA badanych genów elementów zachowywanych głównie u roślin bobowatych. Analiza sekwencji białkowych w/w genów wykazała występowanie konserwowanych domen charakterystycznych w białkach kodowanych przez geny szlaku autonomicznego u rzodkiewnika pospolitego.

Doktorant wykazał również zmiany ekspresji genów *FCA*, *FY*, *FLD*, *FPA* i *FVE* pod wpływem egzogennie podanych hormonów  $GA_3$  i ABA, szczególnie wzrost ich ekspresji w liściach dolnych oraz wzrost ekspresji *FCA* i *FVE* w części wierzchołkowej (w młodym kwiatostanie). Wykazał spadek aktywności transkrypcyjnej badanych genów po zastosowaniu  $GA_3$  w ogonkach liściowych i liściach górnych. Odnotował również wzrost ekspresji genów *FCA*, *FY* i *FLD* w części wierzchołkowej młodych roślin.

W „Streszczeniu” Doktorant napisał, że wzrost ekspresji badanych genów w liściach górnych zaobserwowano wraz ze wzrostem temperatury otoczenia pomiędzy porankiem, a wczesnymi godzinami popołudniowymi. Również we wniosku numer 4 Doktorant twierdzi, że na ekspresję badanych genów mają wpływ fluktuacje temperatury w cyklu dobowym. Nie znalazłam jednak w rozdziale „Wyniki” danych potwierdzających te obserwacje, a część wyników dotycząca wpływu hormonów, temperatury i wieku roślin na ekspresję wybranych genów szlaku autonomicznego została umieszczona w rozdziale „Dyskusja”.

Z pewnością dalsze badania, analizy molekularne i biochemiczne, będą skupiały się na efektach pomiędzy skomplikowanymi warunkami środowiska na kwitnienie roślin. Dane molekularne uzyskane w warunkach bardziej zbliżonych do obserwowanych w warunkach naturalnych powinny dać nowy wgląd w regulację procesu kwitnienia. Bez wątpienia

zrozumienie sieci molekularnych, dzięki którym rośliny włączają fotoperiod i zmiany temperatury do generowania sygnałów indukujących kwitnienie jest niezbędne aby wykorzystać i zrównoważyć skutki globalnej zmiany klimatu i zabezpieczyć przyszłą produkcję roślinną. Obserwowana w ostatnich latach rosnąca temperatura otoczenia i zwiększona zmienność środowiskowa zmieniają fenologię reprodukcyjną roślin, dlatego podjęcie takich badań jest niezbędne dla przyszłego bezpieczeństwa upraw. W związku z tym proszę Doktoranta o rozwinięcie zagadnienia wpływu fluktuacji temperatury na kwitnienie podczas obrony pracy doktorskiej.

W części wyników przedstawiających ilość transkryptu poszczególnych genów brak jest analiz statystycznych, co utrudnia interpretację wyników, a stwierdzenie „Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników” jest niepoprawne.

Dyskusja liczy 17 stron i w pewnych jej częściach znajdują się tabele z danymi i opisy wyników dotyczące wpływu hormonów, temperatury i wieku roślin na ekspresję wybranych genów szlaku autonomicznego.

W rozdziale „Dyskusja” Autor poruszył zagadnienia dotyczące identyfikacji genów szlaku autonomicznego łubinu żółtego i podobieństwa białek w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne zidentyfikowane u innych gatunków roślin, w tym bobowatych; wpływu giberelin, kwasu abscysynowego i temperatury na ekspresję wybranych genów szlaku autonomicznego. Dyskusję zamyka podsumowanie analizy ekspresji genów. Moim zdaniem część podrozdziału „Zakończenie” powinna znaleźć się w podsumowaniu, a przedostatni akapit tłumaczący problemy metodyczne przeprowadzenia doświadczenia związanego z wpływem temperatury na kwitnienie w „Wynikach”.

Pan mgr Mariusz Banach podsumował wyniki badań w formie 4 wniosków. Wyprowadzone wnioski są sformułowane rzetelnie, w pełni uzasadnione i adekwatne do uzyskanych wyników, za wyjątkiem czwartego wniosku, w którym Autor stwierdza, że na ekspresję badanych genów wpływ mają fluktuacje termiczne, do których dochodzi w cyklu dobowym.

Z osiągnięć przedstawionej rozprawy doktorskiej, według mnie, na szczególne podkreślenie zasługują:

- Potwierdzenie występowania i aktywności szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia u tubinu żółtego
- Wykazanie wysokiej homologii białek kodowanych przez badane geny u tubinu żółtego do tubinu wąskolistnego
- Wykazanie wpływu hormonów i wieku roślin na ekspresję badanych genów szlaku autonomicznego

### **Wniosek końcowy**

Dysertacja została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, a wartość jej wyników oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki wnoszą nowe oryginalne wartości poznawcze z zakresu fizjologii i genetyki roślin. Autor posiada umiejętności w zakresie stosowania nowoczesnych metod badawczych i właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Styl, poprawność, przejrzystość i jednoznaczność rozprawy oraz poziom edytorski oceniam pozytywnie.

Praca doktorska mgr Mariusza Banacha spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 29.07.2019 r.

*Edyta Skrzypek*  
dr hab. Edyta Skrzypek