

Poznań, 23.08.2016 r.

Dr hab. Iwona Morkunas, prof. nadzw.
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Edyty Łukaszuk pt. „Reakcje rzodkiewnika
pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.) na uszkodzenia mechaniczne”**

Praca doktorska mgr Edyty Łukaszuk zrealizowana została w Zakładzie Fizjologii Roślin Instytutu Biologii na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem dr hab. Iwony Ciereszko, prof. nadzw..

Praca doktorska jest opracowana zgodnie z wymogami obowiązującymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych; obejmuje w kolejności: *Wykaz stosowanych skrótów* (2,5 strony), *Wstęp* (30 stron), *Cel pracy* (1,5 strony), *Materiał i metody* (21 stron), *Wyniki* (42 strony), *Dyskusja* (19 stron), *Wnioski* (1,5 strony), *Streszczenia* w języku polskim (2 strony) i angielskim (1,5 strony), *Bibliografia* (obejmująca 232 cytowane artykuły literatury światowej, w zdecydowanej większości opublikowane w latach 2000-2014), *Spis 38 rycin i 4 tabele*. Praca w całości liczy 150 stron.

Nadrzędnym celem pracy było zbadanie wpływu zranienia mechanicznego liści rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.), ekotyp Columbia na proces oddychania i aktywność fotosyntetyczną oraz na metabolizm węglowodanów. Oprócz wyżej wymienionych celów Doktorantka zaplanowała również pomiar wskaźników stresu oksydacyjnego (poziomu nadtlenu wodoru, zawartości związków zawierających grupy tiolowe –SH i oszacowanie poziomu peroksydacji lipidów TBARS) oraz zawartości metabolitów wtórnych (antocyjanów, związków fenolowych i tanin) w uszkodzonych mechanicznie tkankach. Badania przeprowadzono na roślinach typu dzikiego (wt) i mutantach hormonalnych takich jak *aos* (mutant z zablokowaną syntezą kwasu jasmonowego, z deficytem JA), *ein4* (mutant niewrażliwy na etylen) i *rcdl-1* (mutant o zredukowanej wrażliwości na ABA, ET i JA). O wpływie zranienia na proces oddychania wnioskowano poprzez oznaczenie intensywności oddychania ciemniowego roślin rzodkiewnika metodą gazometryczną wykorzystując elektrodę tlenową Clarka i poprzez pomiar całkowitej emisji energii cieplnej stosując pomiary

kalorymetryczne. Z kolei o wpływie zranienia na proces fotosyntezy wnioskowano na podstawie określenia intensywności fotosyntetycznego wytwarzania tlenu stosując elektrodę Clarka oraz zawartości węglowodanów (HPLC i metodą spektrofotometryczną) i aktywności kluczowych enzymów związanych z metabolizmem sacharozy (inwertaz; syntazy sacharozy - SuSy i pirofosforylasy UDP-glukozy- UGPazy metodą spektrofotometryczną).

Cele pracy zostały przez Doktorantkę jasno sformułowane na stronie 34 i 35 rozprawy.

W pracy próbowano odpowiedzieć na pytania, cytując:

1. W jakim stopniu uszkodzenie mechaniczne liści rzodkiewnika pospolitego wpływa na podstawowe procesy fizjologiczne – fotosyntezę, oddychanie oraz produkcję cukrów?
2. Czy zranienie zmienia gospodarkę energetyczną (m.in. emisję ciepła wydzielanego przez rośliny)?
3. Jak kształtuje się skład chemiczny, zwłaszcza zawartość cukrów i metabolitów wtórnych, po uszkodzeniu mechanicznym liści?
4. Czy zranienie zmienia aktywność kluczowych enzymów związanych z metabolizmem sacharozy: inwertaz, syntazy sacharozy, UGPazy?
5. Czy istnieje korelacja między zmianami aktywności tych enzymów i zmianami zawartości cukrów w zranionych roślinach?
6. Czy zmiana równowagi hormonalnej u mutantów (deficyt JA, niewrażliwość na ET, ABA, MeJA) wpływa na odpowiedź rośliny na zranienie? Czy któryś z hormonów odgrywa decydującą rolę w odpowiedzi fizjologicznej?
7. Czy uszkodzenie mechaniczne liści rozetowych indukuje stres oksydacyjny?

Temat i cel ocenianej pracy doktorskiej mieszczą się, w moim przekonaniu, w niezwykle ważnym kierunku badawczym w dziedzinie współczesnej biologii, a dokładnie odporności roślin na stres. Podjęcie przez Doktorantkę powyższej tematyki badań z pewnością dostarczyło nowych informacji także dla biotechnologii roślin przydatnych w zakresie wytworzenia stanu tolerancji, a nawet odporności roślin na stale rosnące zagrożenia związane z warunkami stresu abiotycznego i biotycznego.

Mogę też stwierdzić, że temat pracy doktorskiej mgr Edyty Łukaszuk jest jasno sformułowany. Poza tym główny cel jak i postawione przez Doktorantkę cele cząstkowe są interesujące, biorąc pod uwagę fakt, że zranienie mechaniczne, podobnie jak inne czynniki stresowe indukuje biosyntezę fitohormonów stresowych uczestniczących w uruchamianiu reakcji obronnych, które umożliwiają roślinie dostosowanie się do niekorzystnych warunków środowiska. Należy podkreślić, że zainteresowanie Doktorantki wpływem zranienia mechanicznego na oddychanie, aktywność fotosyntetyczną i metabolizm węglowodanów u mutantów *A. thaliana* z

modyfikacją szlaku hormonalnego jest w pełni uzasadnione biorąc pod uwagę fakt, że otrzymane wyniki są całkowicie nowatorskie. Wiedza na temat mechanizmów obronnych roślin indukowanych przez zranienie jest wciąż niewystarczająca, szczególnie na poziomie fizjologicznym i wyniki badań tej dysertacji są istotne dla współczesnej biologii roślin.

Mam tylko jedną uwagę, co do postawionego przez Doktorantkę pytania 6 na str. 35, gdzie Doktorantka pisze, że „W pracy próbowano odpowiedzieć na pytanie:”, cytuję „Czy któryś z hormonów odgrywa decydującą rolę w odpowiedzi fizjologicznej?”. W mojej opinii, aby móc w pełni odpowiedzieć na to pytanie, Doktorantka powinna określić poziom fitohormonów w zranionych tkankach typu dzikiego w czasie trwania eksperymentu i porównać otrzymany wynik w stosunku do kontroli.

Ocena Wstępu

Treści części teoretycznej (*Wstępu*) są podporządkowane tematowi i celowi pracy doktorskiej. W kolejnych podrozdziałach *Wstępu* Doktorantka omówiła zagadnienia dotyczące reakcji roślin na czynniki stresowe, mechanizmy obronne roślin na zranienie, molekularne mechanizmy odpowiedzi roślin na uszkodzenia, rolę hormonów i regulatorów wzrostu w odpowiedzi na zranienie, rolę cukrów w reakcjach roślin na czynniki stresowe, funkcje enzymów hydrolizujących sacharozę (inwertaz, syntazy sacharozy i pirofosforylasy UDP-glukozy), regulację metabolizmu roślin przez fitohormony i cukry.

Należy zaznaczyć, że najlepiej napisanym przez Doktorantkę podrozdziałem we *Wstępie* jest podrozdział dotyczący funkcji enzymów hydrolizujących sacharozę, a zatem tematyka będąca przedmiotem zainteresowania przez wiele lat Pani dr hab. Iwony Ciereszko, prof. nadzw.. Ponadto należy wspomnieć, że wiele prac cytowanych we *Wstępie* to publikacje z ostatnich 10 lat badań.

Poza tym mam kilka uwag dotyczących *Wstępu*: w mojej opinii brakuje treści dotyczących wpływu zranienia na podstawowe procesy fizjologiczne, tj. fotosyntezę i oddychanie, które były przedmiotem badań niniejszej dysertacji. Dodatkowo na str. 5, podrozdział „Reakcje roślin na czynniki stresowe”, brakuje odniesienia literaturowego do zdania cytuję „Reakcja roślin na działanie czynnika stresowego obejmuje trzy fazy: fazę alarmu, odporności i wyczerpania”. Ponadto zamiast „fazy odporności” powinna być wymieniona „faza obrony”, co byłoby bardziej właściwym określeniem, ponieważ w tekście nie jest podane jakiego typu są to oddziaływania pomiędzy rośliną i stresem. Ponadto podrozdział dotyczący regulacji metabolizmu przez fitohormony i cukry mógłby być bardziej

rozbudowany i wzbogacony graficznie, bowiem w publikowanej literaturze jest wiele badań dotyczących tej tematyki.

Materiał i Metody

Zarówno materiał roślinny jak i stosowane metody w pracy doktorskiej zostały szczegółowo opisane przez Doktorantkę. Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń dotyczących treści zawartych w tym rozdziale. Mgr Edyta Łukaszuk włożyła duży wkład pracy i obok podstawowych metod fizjologiczno-biochemicznych zastosowała także nowoczesne metody badawcze z zakresu biologii eksperymentalnej takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa HPLC i spektrometria FT-ramanowska, dzięki współpracy ze specjalistą z innego ośrodka naukowego. Mam drobne, następujące uwagi, które w żaden sposób nie umniejszają wartości tego rozdziału:

- Autorka nie podała czym kierowała się wybierając do badań ekotyp Columbia *Arabidopsis thaliana* i mutanty hormonalne (*aos*, *ein4* i *rcd1-1*) oraz nie podała przyczyny wyboru stadium rozwojowego rośliny

- w tekście rozdziału Materiał i Metody występują nieliczne błędy literowe str. 36, str. 40, str. 52

- Autorka niekiedy używa żargonu laboratoryjnego np. „Zwirowane próby”

Ponadto nie mam uwag, co do opisanych przez Doktorantkę metod badawczych stosowanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Należy wspomnieć także, że otrzymane przez Doktorantkę wyniki zostały poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem analizy wariancji ANOVA dla układów czynnikowych. Uzyskanie istotnego wyniku w analizie wariancji było podstawą wykonania testów post-hoc. Istotne różnice pomiędzy porównywanymi średnimi wykrywano testem Duncana.

Wyniki i Dyskusja

Szczególnie rozdział *Wyniki i Dyskusja* zasługują na pozytywną ocenę. Na ponad 42 stronach rozprawy Doktorantka szczegółowo przedstawia rezultaty wykonanych przez siebie analiz takich jak: analiza wzrostu rzodkiewnika, zmiany składu chemicznego na podstawie spektrometrii FT-ramanowskiej, zawartość barwników fotosyntetycznych u rzodkiewnika po zranieniu liści rozetowych, fluorescencję chlorofilu a po zranieniu liści rozetowych rzodkiewnika, wpływ zranienia na intensywność fotosyntezy i oddychania u rzodkiewnika, wpływ zranienia na aktywność metaboliczną – badania kalorymetryczne emisji ciepła (emisję specyficznego ciepła i energii cieplnej), zawartość glukozy i sacharozy oznaczanych enzymatycznie, zawartość cukrów oznaczanych metodą wysokosprawnej chromatografii

cieczowej, wpływ uszkodzenia liści na zawartość skrobi, identyfikację kalozy w liściach rzodkiewnika po zranieniu, aktywność enzymów przemian węglowodanów po zranieniu liści rozetowych rzodkiewnika (aktywność inwertaz kwaśnych - wakuolarnej i apoplastycznej, aktywność inwertazy obojętnej, aktywność syntazy sacharozy oraz aktywność pirofosforylazy UDP-glukozy), zawartość metabolitów wtórnych po uszkodzeniu mechanicznym liści rzodkiewnika (zawartość antocyjanów i związków fenolowych, zawartość polifenoli i tanin), natężenie stresu oksydacyjnego po zranieniu liści rozetowych rzodkiewnika (histochemiczną detekcją H_2O_2 w liściach rzodkiewnika, zawartość H_2O_2 w liściach rozetowych rzodkiewnika, wpływ zranienia na zawartość produktów peroksydacji lipidów i uszkodzenia oksydacyjne białek po zranieniu liści).

Rozdział *Wyniki* jest napisany precyzyjnie i jasno, co świadczy o umiejętności właściwej analizy wyników przez Doktorantkę. W końcowej części rozdziału *Dyskusja*, tj. w Podsumowaniu jak i w rozdziale *Wnioski* autorka podsumowała w skondensowanej formie uzyskane wyniki. Z przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła 13 wniosków. Nie sposób w zwięzłej recenzji przedstawić i skomentować wszystkie uzyskane przez Doktorantkę wyniki. Przykładowo, Autorka posługując się spektrometrią FT ramanowską określiła podobieństwo składu chemicznego wykazując, że spośród badanych roślin kontrolnych, niezranionych najbardziej zbliżony do roślin typu dzikiego (wt) był mutant z deficytem JA (*aos*), natomiast najbardziej odmiennym składem chemicznym charakteryzował się mutant z deficytem ET (*ein4*). Ponadto zranienie spowodowało zmiany w ogólnym składzie chemicznym roślin, co przedstawiono na dendrogramach dla widm FT ramanowskich liści *A. thaliana*. Ponadto Doktorantka badając emisję energii cieplnej stwierdziła, że krótkotrwały stres nie powodował znacznej intensyfikacji przemian metabolicznych. Wykorzystując metodę histochemiczną i spektrofotometryczną wykazała, że w reakcji na zranienie u roślin typu dzikiego (wt) jako pierwsze uruchamiane są reakcje obronne takie jak synteza kalozy, H_2O_2 i wzrost aktywności inwertazy apoplastycznej. Zaobserwowane wzmożone generowanie H_2O_2 w pobliżu zranienia i w wiązkach przewodzących wskazuje na funkcję ochronną i sygnalizacyjną tej molekuly. Poza tym stosując elektrodę tlenową Clarka Doktorantka zaobserwowała zwiększenie intensywności oddychania po uszkodzeniu liści oraz stwierdziła, że zranienie nie powodowało zmian w aktywności fotosyntetycznej. Następnie analiza odpowiedzi na zranienie u mutantów ujawniła, że mutanty charakteryzowały się obniżoną fotosyntezą i niższą mocą cieplną w stosunku do roślin typu dzikiego (wt), co było najbardziej widoczne u mutantu z deficytem JA, ABA, ET (*rcd1-1*) i u mutantu z deficytem JA (*aos*). Po raz pierwszy pokazano, że nacięcie liści u *rcd1-1* powodowało obniżenie zawartości chlorofilu i zawartości chlorofilu a (NPQ, qP,

QY), zwiększenie mocy cieplnej, zwiększenie aktywności SuSy i UGPazy wraz z nagromadzeniem sacharozy i wzrostem aktywności inwertaz (cwINV, VIN i CIN). Ponadto proszę Doktorantkę o wyjaśnienie wniosku 10, str. 119, gdzie pisze cytując „Niewrażliwość na etylen u ein4 nie powodowała zmian w reakcji roślin na uszkodzenie rozet liściowych”. Analizując wyniki niektóre ze wskaźników wykazują zmiany na zranienie, np. ryc. 17, str. 69 i ryc. 20 str. 74, proszę o komentarz.

Uwagi ogólne

Oceniając całokształt niniejszej rozprawy powinnam podkreślić, że cała praca napisana jest prawidłowo i przejrzysto oraz zawiera jasną graficzną dokumentację. W tekście występują tylko nieliczne błędy stylistyczne, literowe i personifikacje.

Mam kilka pytań do Kandydatki:

1. Jak wyjaśnić, różnice w zawartości cukrów w liściach *A. thaliana* oznaczanych enzymatycznie i HPLC
2. Czym spowodowane są różnice w aktywności UGPazy w odpowiedzi na zranienie u zastosowanych mutantów

Podsumowanie

1. Wysoko pod względem merytorycznym oceniam napisany przez mgr Edytę Łukaszuk rozdział *Wyniki* i *Dyskusję*. Należy podkreślić, że w *Dyskusji* Doktorantka szczegółowo omówiła uzyskane wyniki na tle dostępnych pozycji literaturowych.
 2. Stwierdzam, że mgr Edyta Łukaszuk w czasie realizacji celów pracy doktorskiej przeanalizowała bogatą literaturę (aż 232 pozycje), co wskazuje na dobrą orientację w problematyce badawczej
 3. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zasługują na zainteresowanie i uwagę badaczy zajmujących się tematyką dotyczącą odpowiedzi roślin na czynniki stresowe
 4. Otrzymane przez Doktorantkę interesujące wyniki powinny być opublikowane w specjalistycznych czasopismach
- Pragnę równocześnie podkreślić, że zawarte w recenzji nieliczne uwagi, komentarze i sugestie nie pomniejszają wartości merytorycznej pracy.

Wnioski końcowe

W mojej ocenie rozprawa mgr Edyty Łukaszuk spełnia wszystkie wymagania ustawy o stopniach i tytułach naukowych. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego w Białymstoku o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Edyty Łukaszuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę nakład pracy Doktorantki i włączenie szeregu metod badawczych do realizacji celów pracy oraz ze względu na nowatorstwo wyników badań wnoszę o wyróżnienie pracy.

Dr hab. Iwona Morkunas, prof. nadzw.

I. Morkunas