

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Bizana  
pt. „Rola białka germinopodobnego z *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) w rozwoju  
i w odpowiedzi na stresy środowiskowe”.**

**Znaczenie naukowe rozprawy**

Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Bizana to ważne osiągnięcie naukowe wnoszące niezwykle cenne dane dotyczące roli korzeniowo - specyficznego białka germinopodobnego (GLP) we wzroście i rozwoju kryształki lśniącej (*Mesembryanthemum crystallinum* (L.)) i jej adaptacji do życia w warunkach deficytu wody. W korzeniach tego fakultatywnego halofitu z rodziny *Aizoaceae*, rzędu *Caryophyllales*, stanowiącego model w badaniach związanych z reakcją na stres środowiskowy, 28 lat temu zidentyfikowano transkrypt białka germinopodobnego McGLP, lecz jego lokalizacja komórkowa i funkcja do momentu rozpoczęcia badań przez doktoranta nie była znana. Uznanie budzi szeroki, wielopoziomowy zakres badań tj. na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym.

**Podsumowując, podjęte w rozprawie badania uważam za niezwykle cenne nie tylko ze względu na dostarczenie nowych danych dotyczących struktury, lokalizacji i funkcji białka głównie ocenianej na podstawie nadekspresji genu kodującego to białko w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*, ale również ze względu na potencjalne wykorzystanie tej wiedzy w praktyce w celu zwiększania plonowania roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych (źródło genów odpowiedzialnych za wzrost tolerancji na stres solny, na niską temperaturę).**

**Uwagi szczegółowe**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Jakuba Bizana jest typową monografią liczącą 148 stron.

Układ pracy jest przejrzysty, w zasadzie zachowujący przyjęte reguły pisania tego typu rozpraw naukowych w Polsce, czyli zawiera typowe rozdziały tj. streszczenie po polsku i angielsku (dlaczego znajduje się na końcu rozprawy?), wykaz skrótów, wstęp (czyli odpowiednik przeglądu literatury w innych rozprawach), cel pracy i hipotezy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz rzadko spotykany, ale cenny rozdział - kierunek dalszych badań i spis literatury.

Poniżej omawiam wymienione rozdziały rozprawy umieszczając na bieżąco komentarze i pytania do Doktoranta.

### **Tytuł rozprawy**

Tytuł nie odzwierciedla zawartości pracy - przecież wpływ tego białka (brak nazwy tego białka (McGLP)) na wzrost i rozwój badano głównie u *Arabidopsis* i to zarówno poprzez analizę ekspresji genu kodującego to białko i wpływ tej nadekspresji na wiele procesów fizjologicznych i biochemicznych. Oczywiście analizowano też wpływ tego białka na rozwój krysztalka i jego znaczenie w stresie abiotycznym, ale to jest 1/3 wszystkich badań. Uważam, że tytuł powinien być bardziej precyzyjny.

### **Wstęp**

Autor na 21stronach opisał aktualny stan wiedzy o germinach i białkach im podobnych, dotyczący ich budowy i różnorodnych funkcji (enzymy - głównie związane z odpornością na wszelkie stresse abiotyczne i biotyczne, chaperony, białka zapasowe). Dalsze fragmenty wstępu dokładnie opisują dwie rośliny modelowe: (1) krysztalka lśniaca i (2) rzodkiewnik pospolity wykorzystany do analizy wpływu wprowadzenia transgenów tj. ocenianie konsekwencji ich nadekspresji na różne procesy fizjologiczne w tym na odporność na stresse. Podrozdziały 1.2.2 i 1.2.3 rozbijają śledzenie informacji o tych roślinach modelowych; informacje o GLP można było umieścić w rozdziale 1.1 o białkach, bądź razem z podrozdziałem 1.2.2 powinny znaleźć się na końcu przeglądu w uzasadnieniu i celu badań.

Tabelaryczne zestawienia i zdjęcia w sposób przejrzysty przybliżyły stadia rozwojowe tych dwóch roślin modelowych. Szkoda, że poszczególne zdjęcia dotyczące stadiów rozwojowych krysztalki nie były wkomponowane w tekst co ułatwiłoby płynne śledzenie tekstu.

W dalszej części przeglądu literatury Doktorant opisuje fitohormony z grupy stymulatorów wzrostu tj. auksyny, cytokininy i gibereliny oraz ich różne funkcje w roślinach. Za mało są jednak uwypuklone dane związane z udziałem omówionych fitohormonów w procesach adaptacyjnych na działanie różnych stresów środowiskowych, które można było przygotować

w formie tabeli i wtedy łatwo prześledzić jaki hormon w jakich stresach ujawnia swoje działanie (Proszę o przedstawienie takiej informacji w prezentacji podczas obrony). Biosynteza giberelin jest opisana nieprecyzyjnie. Autor cytuje Yamaguchi z 2008 roku i powstawanie biologicznie aktywnych giberelin, ale szlak wymienionych aktywnych giberelin jest nieco inny. Mianowicie, ostatni etap biosyntezy giberelin ma miejsce w cytoplazmie i obejmuje 2 szlaki (1) 13 - niehydroksylowany i (2)13 - hydroksylowany. Pierwszy szlak rozpoczyna się od przemian  $GA_{12}$  i prowadzi do powstania  $GA_4$  i  $GA_7$ , natomiast drugi szlak zaczyna się od  $GA_{53}$ , która powstaje w wyniku hydroksylacji  $GA_{12}$  przy trzynastym atomie węgla i powstają w tym szlaku  $GA_{20}$  z której bezpośrednio powstaje  $GA_1$  oraz  $GA_5$ . Z  $GA_5$  powstaje powszechnie znana  $GA_3$  i  $GA_6$ .  $GA_5$  i  $GA_6$  mogą funkcjonować jako bioaktywne cząsteczki.

Jaki związek z giberelinami ma u *Arabidopsis* nadekspresja genu *PeSCL* z topoli? (str. 23, linijka 8 od góry) - to wtrącenie jest bez pełnego wyjaśnienia.

Ostatni fragment przeglądu literatury opisuje najważniejszy proces na świecie, czyli fotosyntezę i jej zakłócenia spowodowane niedoborem wody. Oprócz podręcznikowych informacji autor cytuje liczne prace badawcze, dokumentujące spadek zawartości chlorofilu a i b pod wpływem stresu spowodowanego brakiem wody - katabolizm tych barwników spowodowany jest wzrostem aktywności enzymów odpowiedzialnych za degradację tych barwników. Przyspieszenie katabolizmu barwników, zaburzenie stosunku chlorofilu a do b, i co się z tym wiąże, ograniczenie zakresu absorpcji światła, zakłócenie przepływu elektronów i wywołanie stresu oksydacyjnego w warunkach deficytu wody w konsekwencji zaburza przebieg fazy jasnej fotosyntezy i tym samym produkcję ATP i NADPH, które są niezbędne w fazie ciemnej fotosyntezy podczas której ma miejsce wiązanie  $CO_2$ . W warunkach deficytu wody również pobieranie tego gazu jest ograniczane z powodu przemykania aparatów szparkowych. Te wszystkie zaburzenia obu faz spowodowane deficytem wody obniżają w rezultacie wydajność fotosyntezy i tym samym wpływają na stan zdrowotny rośliny. Tym zaburzeniom w obu fazach fotosyntezy związanych z niedoborem wody towarzyszy nadprodukcja reaktywnych form tlenu, która powoduje tzw. stres oksydacyjny. Autor opisuje niekorzystny wpływ najważniejszych reaktywnych form tlenu (anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru i rodnik hydroksylowy) produkowanych w warunkach stresowych, w tym w deficycie wody. W ostatnim rozdziale wstępu Autor przedstawia przydatność białek germinopodobnych do ograniczenia nadmiaru stresu oksydacyjnego. U wielu roślin białka te wykazują aktywność enzymów antyoksydacyjnych

z grupy dysmutaz ponadtlenkowych. Taką aktywność stwierdzono dla GLP u mchów, nektaryny, tytoniu i jęczmienia. Aktywność dysmutazową wykazał również dla McGLP z kryształki lśniącej Promotor tej pracy i jej Autor (str. 147 rozprawy, poz. 312 - rok 2019).

**Reasumując, przedstawiony w rozprawie przegląd literatury w charakterze Wstępu świadczy o bardzo dobrym teoretycznym przygotowaniu Doktoranta do realizacji ambitnych celów.**

Rozdział ten nie jest wolny od błędów natury językowej, edycyjnej i stylistycznej, poniżej wymieniam tylko niektóre:

**str.9**

7 linijka od dołu - cyt. „w czasie kiełkowania również innych gatunków roślin”- rośliny nie kiełkują tylko nasiona;

2 linijka od dołu - nie rozszyfrowane skróty RGD, KGD, KGE - powinny być w wykazie skrótów.

**str.14**

Tytuł rozdziału 1.2.2 „Praktyczne znaczenie badań nad fizjologią *M. crystallinum*” nie odpowiada treści - z fizjologii *M. crystallinum* tylko wspomniana jest fotosynteza, a potem jest trochę informacji o biologii odporności.

**str. 19**

7 linijka od dołu to nie są białka nośne auksyny tylko nośnikowe.

**str. 23**

3 linijka od góry cyt. „gibereliny regulują wiele aspektów wzrostu i rozwoju” - gibereliny regulują nie aspekty tylko procesy.

### **Cel pracy i hipotezy**

Cel pracy jest powtórzeniem tytułu i podobnie jak tytuł jest nieprecyzyjny. Szkoda, że jak zaznaczyłam wcześniej, nie pokusił się Autor o przedstawienie uzasadnienia celu pracy, które niesłusznie zawarte jest w kilku fragmentach Wstępu.

### **Materiał i metody**

Jest to obszerny rozdział z 7 rozdziałami i licznymi podrozdziałami świadczący o ogromnym wkładzie, jaki musiał Doktorant włożyć, aby zrealizować postawione sobie cele. Opanował szereg metod i technik badawczych z zakresu fizjologii roślin, kultur *in vitro* oraz biologii molekularnej, w tym analizę ilościową ekspresji genów metodą RT-qPCR i analizy bioinformatyczne, pomiary spektrofotometryczne, chromatograficzne, transformacji

genetycznej, mikroskopowe i statystyczne. **Ten szeroki warsztat badawczy zasługuje na wielkie uznanie.**

#### Uwagi i pytania

Rozdział 3.1.1 jest napisany nieprecyzyjnie z błędami natury stylistycznej i terminologicznej. Co to są hodowle ziemne? Powinna być uprawa. Jak rośliny mogły zostać przygotowane na doniczkach? Jak wyglądało umieszczanie nasion na doniczkach, a nie w torfie? Jak prowadzi się hodowlę? powinno być np. Po 24 uzyskane rośliny wykorzystano w badaniach.

Rozdział 3.1.2 Jaka to hodowla, co uzyskano po 14 dniach hodowli? Nasiona kiełkowano w warunkach *in vitro* na pożywce MS - to jest ta hodowla? Jest to po prostu kiełkowanie nasion w warunkach *in vitro*. Razi użycie sformułowania hodowlę prowadzono (za rączkę?).

Rozdział 3.1.4 Zamiast infekcja, powinna być inokulacja. Czy inokulum stanowiła zawiesina bakterii *Agrobacterium* (przez c) *tumefaciens* czy *rhizogenes*.

Rozdział 3.4.1 Zamiast Analiza przyrostu masy powinno być Oznaczanie świeżej masy roślin (skąd wiadomo czy po 33 dniach będzie przyrost masy czy nie?).

Nie hodowlę sprawdzano, tylko kiełkowanie nasion codziennie przez 9 dni. Nie stosuje się już od wielu lat terminu siła kiełkowania tylko zdolność kiełkowania nasion.

Rozdział 3.4.5 i 3.4.10 - nie ilość tylko **liczba**.

#### Wyniki

Zostały opisane w 5 rozdziałach na 34 stronach obejmujących 26 wykresów (nie rycin), 6 rycin, 12 fotografii i 7 tabel.

Pierwszy rozdział rozprawy Doktorant poświęcił omówieniu wyników uzyskanych z analiz bioinformatycznych obejmujących (1) porównanie sekwencji genu *McGLP* zamieszczonej w bazie danych NCBI i sekwencji genu *McGLP-BIS* otrzymanej w wyniku sekwencjonowania przez Genomed, a następnie (2) porównanie sekwencji białka *McGLP* zamieszczonej we wspomnianej bazie z sekwencją aminokwasową *McGLP-BIS* wyznaczoną na podstawie nowej sekwencji otrzymanej z Genomed oraz (3) analizę filogenetyczną sekwencji aminokwasowej *McGLP-BIS* pozwalającą na stworzenie drzewa filogenetycznego i wykazanie, że badane białko jest blisko spokrewnione z innymi białkami *GLP* wykrytymi u przedstawicieli różnych grup systematycznych roślin w tym u mchów, rzodkiewnika, tytoniu, a także drzew (topola). Białko to wraz z *GLP* z buraka cukrowego tworzy ten sam kład. Doktorant wykorzystał również inne narzędzia bioinformatyczne do

analizy sekwencji białek takie jak *TargetP1.1* oraz *WoLF PSORT* i *Phyre2*, które pozwoliły na ustalenie, że badane białko McGLP-BIS nie posiada sygnału retencji do cytoplazmy, retikulum endoplazmatycznego, jadra komórkowego, mitochondriów i wakuoli, ale z dużym prawdopodobieństwem jest białkiem wydzielniczym. Wykorzystując narzędzie bioinformatyczne *Phyre2*, wykazał Doktorant, że McGLP-BIS wykazuje wysoki stopień homologii strukturalnej z globuliną zapasową nasion (7S), głównie z jęczmienia (44% sekwencji tego białka wykazuje pełną homologię z białkiem zapasowym 7S jęczmienia zwyczajnego). Ten sam program pozwolił na wygenerowanie modelu budowy tego białka - jest to struktura III - rzędowa z elementami  $\alpha$  -helisy,  $\beta$  - harmonijki, helisy transbłonowej oraz z sekwencjami nieuporządkowanymi.

Kolejny rozdział poświęcony jest wprowadzaniu genu kodującego białko McGLP-BIS wyżej scharakteryzowane do rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* i sprawdzenie skuteczności transformacji przy użyciu *Agrobacterium* dwoma metodami: mikroskopową zielonej fluorescencji białka fuzyjnego McGLPBIS: GFP i i immunodetekcji tego białka (w rozprawie brakuje paru zdań wprowadzających czytelnika, jak wyżej, do śledzenia kolejnego rozdziału). Metody potwierdziły skuteczność transformacji dwutygodniowych homozygotycznych roślin linii 1A, 1E i 3C. Do dalszych badań wybrano linię 3C, gdyż sygnał białka fuzyjnego McGLP-BIS: GFP w przeciwieństwie do linii 1A, 1E miał miejsce zarówno w korzeniach jak i liściach; chociaż nie był tkankowo specyficzny, bo fluorescencja obserwowana była zarówno w komórkach epidermy jak i miękiszu i żywych komórkach walca osiowego. Przy zastosowaniu mikroskopu konfokalnego udało się Doktorantowi ustalić lokalizację tego białka w komórkach. Jednorodny i ciągły sygnał GFP zarówno w korzeniach jak i liściach wykryto w ścianach komórkowych i przestrzeniach międzykomórkowych komórek oraz w rejonach przyściennych cytoplazmy, natomiast w obrębie całej komórki zielony sygnał też był obecny, ale w formie rozproszonej.

Dwa kolejne rozdziały (4.3 i 4.4) poświęcone są omówieniu wyników związanych z wpływem nadekspresji genu *McGLPBIS* na procesy morfogenetyczne, fizjologiczne i biochemiczne u roślin *Arabidopsis thaliana* linii 3C i dla porównania u roślin typu dzikiego oznaczonych skrótem WT. (Dlaczego w tytule rozdziału 4.3 jest cyt. „w warunkach stresowych” - a jaki to był stres; w metodyce dotyczącej tych doświadczeń nie ma mowy o stresie, w opisie wyników też nie ma o tym mowy, dopiero w rozdziale 4.4 okazało się, że tym stresem był deficyt wody).



Doktorant analizował w **rozdziale 4.3** zdolność do produkcji nasion (liczbę uzyskanych nasion, ich wielkość, masę), procent kiełkowania nasion (nie siłę), rozwój pędów i liści (liczbę i czas pojawienia się rozgałęzień pędów, ich wysokość, szerokość rozety liści), zakwitanie (czas) i powstanie łuszczyń (liczba). Stwierdził, że nie było istotnych różnic w zdolności do produkcji nasion przez 6 tygodniowe rośliny dzikie i transgeniczne i w ich zdolności do kiełkowania. Co ciekawe, nie było różnic w masie nasion roślin WT i linii 3C, chociaż nasiona tych roślin istotnie różniły się rozmiarem; nasiona WT roślin były istotnie dłuższe i szersze od nasion wyprodukowanych przez rośliny transgeniczne (3C). W jednodniowych siewkach wyrosłych z nasion linii transgenicznej było na korzeniach 2 razy więcej korzeni włóśnikowych niż na korzeniach siewek roślin WT. Po 6 tygodniach wzrostu wysokość roślin WT i 3C była podobna, natomiast rośliny różniły się liczbą rozgałęzień; rośliny WT miały ich mniej i tylko były to rozgałęzienia pierwszorzędowe, natomiast u roślin 3C było ich więcej i były dodatkowo rozgałęzienia drugo - i trzeciorzędowe. Nie było różnic pomiędzy roślinami WT i 3C w czasie zakwitania roślin jak i liczbie wytworzonych łuszczyń. **Reasumując, jedyna różnica ujawniła się w wielkości nasion i liczbie korzeni włóśnikowych na korzeniach siedmiodniowych siewek (brak takiego podsumowania).**

#### Uwagi do rozdziału 4.3.

Tytuł rozdziału 4.3 - powinny brzmieć: Wpływ nadekspresji genu... na procesy morfogenetyczne itp. (*Analiza* to sformułowania do metodyki, ponadto nie analizuje się parametrów wzrostowych tylko procesy: produkcję nasion, wytwarzanie korzeni włóśnikowych, itp.). Podobnie tytuł kolejnego rozdziału powinien brzmieć inaczej.

Kolejność omawiania wyników w rozdziale 4.3 jest nielogiczna - najpierw powinna być omówiona produkcja nasion i morfologia, a potem zdolność ich kiełkowania oraz powstawanie korzeni włóśnikowych.

Wykres 14 (przez autora zwany ryciną) jest opisany nieprecyzyjnie, zarówno tytuł jak i osie. Powinno być:

*tytuł:* Kiełkowanie nasion... na pożywce MS. *Osie:* x - Czas, dni, y- Kiełkowanie (%)

Niezrozumiałe jest pierwsze zdanie na str. 77 o jaką charakterystykę wzrostu chodzi? Po prostu zdolność kiełkowania nasion obu linii była podobna, w pierwszym dniu skiełkowały prawie wszystkie (około 80%), a w drugim dniu „dokiełkowała” reszta nasion, zostało parę „niedobitków” w nasion WT. Szkoda, że autor nie sfotografował tych siewek w ciągu tych

7 dni wówczas mógłby wyciągnąć wniosek o wpływie transformacji na rozwój siewek. Dlatego wniosek 5 (str. 116) cyt. „przejawia się szybszym rozwojem siewek,” jest na wyrost - a gdzie jeszcze przedstawiony rozwój siewek - w pracy jest tylko Fot. 8 przedstawiająca kiełkujące nasiona w pierwszym dniu z wynurzającym się korzeniem zarodkowym i liczba korzeni włóśnikowych na korzeniu siedmiodniowej siewki, której fotografii nie ma (są jedynie korzenie Fot. 7 i wykres 16). Tytuł wykresu 18 nie powinien brzmieć Liczba łuszczyn tylko: Produkcja łuszczyn przez.....

W kolejnym **rozdziale 4.4** Doktorant omawia wpływ nadekspresji genu *McGLPBIS* na podstawowe procesy fizjologiczne i biochemiczne (nie parametry roślin !! str. 81) takie jak fotosynteza netto, aktywność fotosystemu II, produkcję barwników (chlorofile i antocyjany), aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i endogenny poziom  $H_2O_2$ , przewodnictwo szparkowe i intensywność transpiracji, a także zawartość endogennych giberelin i cytokinin oraz biomasę głównie u roślin rosnących 33 dni w warunkach braku deficytu wodnego (codzienne podlewanie). Wpływ tej transformacji na niektóre z wymienionych procesów był badany również w warunkach deficytu wodnego (brak podlewania przez 9 ostatnich dni).

*Szkoda, że Doktorant nie napisał w metodyce jak ten deficyt uzyskał (na str. 47 jest tylko wzmianka o metodzie Barnes'a z 1992 roku, ale jaka to metoda ani słowa. Mógł wspomnieć o tym w Rozdziale 4.4.1 (str. 82), bo tam już jest omawiany deficyt, ale dopiero kilka kartek dalej można znaleźć informacje o tym jaki to był deficyt (str. 85). W tytule tego rozdziału ani słowa o deficycie wodnym, a z kolei w tytule poprzedniego rozdziału było sformułowanie „warunki stresowe”, a w rzeczywistości ich nie rozważano.*

Doktorant potwierdził, że deficyt wodny w trakcie rozwoju roślin skutkuje zwiększeniem stresu oksydacyjnego; rośliny WT *Arabidopsis* w warunkach deficytu wodnego charakteryzowały się dwukrotnie wyższym poziomem nadtlenku wodoru niż rośliny nie poddane temu stresowi. Natomiast u roślin 3C, z nadekspresją genu *McGLPBIS*, nie stwierdzono zmian stężenia  $H_2O_2$ , podczas deficytu wodnego co sugeruje, że kodowane przez ten gen białko o właściwościach SOD może spełniać ważną rolę w zabezpieczeniu roślin przed nadmiarem nadtlenku. W roślinach tych zarówno przy braku deficytu wodnego lub podczas wystąpienia tego stresu jest wyższa aktywność tego enzymatycznego antyoksydantu w porównaniu do roślin nie transgenicznych. Doktorant wykazał, że 3 z 4 izoform SOD tj. MnSOD, FeSOD i Cu/ZNSOD w roślinach 3C charakteryzowały się wyższą aktywnością w porównaniu do ich aktywności w roślinach WT. Na podstawie wcześniej uzyskanych wyników (że czyste białko *McGLPBIS* posiada aktywność MnSOD) i prezentowanych w tej



pracy (że jest ono ekspresjonowane w roślinach 3C pod konstytutywnym promotorem) może tłumaczyć wyższą aktywność SOD u roślin 3C.

Doktorant nie stwierdził różnic w intensywności fotosyntezy netto, intensywności transpiracji u roślin WT i 3C w warunkach braku deficytu, natomiast w warunkach deficytu u roślin 3C wskaźnik fotosyntezy netto był wyższy. O ile deficyt wodny u roślin typu dzikiego obniżał o połowę zawartość całkowitą chlorofili i stosunek chlorofilu a do b, to u roślin transgenicznych nie miał istotnego wpływu na ich zawartość. Zawartość antocyjanów w liściach roślin WT poddanych stresowi wodnemu była wyraźnie wyższa niż w liściach roślin 3C. Aktywność fotosystemu PSII (pomiar fluorescencji chlorofilu a) była podobna u roślin WT i 3C w warunkach nie stresowych; natomiast w warunkach deficytu wodnego aktywność tego systemu była wyższa u roślin 3C. Deficyt wodny spowodował także zmiany w wyglądzie rozetek liściowych, niekorzystnie wpłynął na liście roślin WT; były mniejsze i zmieniły barwę, stały się pomarszczone. Takich objawów nie stwierdzono u roślin 3C w warunkach deficytu wodnego, co więcej wytwarzały one pęd kwiatowy z zawiązkami kwiatów. Deficyt wodny nie miał również negatywnego wpływu na biomasę roślin 3C, w przeciwieństwie do roślin WT gdzie zanotowano 2 - krotny spadek masy.

Rozdział 4.4.1 Doktorant podjął się również porównania oceny poziomu giberelin i cytokinin u roślin WT i 3C nie poddanych deficytowi wodnemu (nigdzie nie jest zaznaczone czy do analiz przeznaczone były całe rośliny, czy tylko fragmenty np. rozety). Nie stwierdzono różnic w zawartości wolnych cytokinin, jedynie u roślin 3C zawartość cytokinin w formie rybozydów była około 30% niższa. Poziom zawartości biologicznie aktywnych giberelin GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> był wyższy u roślin 3C niż u roślin WT, z tym, że więcej GA<sub>1</sub> było w młodszych roślinach 2 - tygodniowych w porównaniu do 6 - tygodniowych, a GA<sub>3</sub> więcej w 6 - tygodniowych niż roślin WT. GA<sub>4</sub> we wszystkich roślinach była na takim samym poziomie.

Doktorant nie analizował poziomu endogennych auksyn, kluczowych fitohormonów uczestniczących w powstawaniu korzeni, przyjmując, że biosynteza auksyn u roślin jest wysoce konserwatywna i pozwala oszacować poziom auksyn na podstawie analizy ekspresji genów uczestniczących w tym szlaku. Wytypował jeden gen kodujący enzym uczestniczący w przekształcaniu prekursora auksyn tryptofanu do IAA tj. aminotransferazy tryptofanu - gen ten to *TAA1*. Podobnie spośród genów kodujących białka wypływu auksyn z grupy PIN-LIKE (PILS) wytypował geny *PILS3* i *PILS4* (jak zaznaczałam wcześniej, brakuje kilku zdań

wprowadzających do kolejnych rozdziałów; żeby odkodować skróty trzeba sięgać do wykazu skrótów).

Doktorant zanotował dwukrotnie niższą ekspresję genu *TAA* i 2 - krotnie wyższą ekspresję genu *PILS3* u roślin 3C w porównaniu do roślin WT.

**Reasumując, należy podkreślić, że Doktorant dostarczył nowych danych dotyczących skutków wprowadzania transgenów do roślin, takich jak zmiany w metabolizmie fitohormonów, głównych stymulatorów wzrostu i rozwoju roślin; konsekwencje tych zmian ujawniają się między innymi w postaci zmian morfologicznych.**

Ostatni rozdział Wyniki czyli **rozdział 4.5** poświęcony jest białku i roślinie (kryształce lśniącej) wymienionych w tytule rozprawy. Opis wyników w tym rozdziale jest lakoniczny, zajmuje tylko 4 strony i 4 wykresy. Żadnego zdania wprowadzającego jakiemu celowi służyła analiza jabłczanu. Tytuł wykresu 27 jest nieprawidłowy - autor zatytułował go „Różnica stężenia jabłczanu, a nie było różnicy!! Powinien zaczynać Zawartość jabłczanu itp. Ponadto fotoperiod to stosunek długości dnia do nocy, więc nie można używać sformułowania „na początku i końcu fotoperiodu”. Wyniki są skomentowane 2 zdaniem, w tym drugie jest niepoprawnie sformułowane.

Na kolejnych 3 wykresach (28, 29 i 30) Doktorant przedstawił wyniki ekspresji genu *McGLP-BIS* kolejno w zależności od wieku korzeni, ich wzrostu w warunkach zasolenia i obecności inhibitora transportu auksyn oraz NAA. Ekspresja tego genu rosła w miarę upływu czasu, przez 6 tygodni wzrostu zwiększył się poziom ekspresji o 90 razy, zasolenie nie miało wpływu. Inhibitor transportu auksyn obniżał jego ekspresję, natomiast egzogeny NAA podwyższał.

Uwagi Wykresy 29 i 30 - brakuje podania wieku roślin z których pochodziły korzenie (dopiero z dyskusji wyników można było się dowiedzieć w jakim wieku były korzenie). W metodyce opisującej te doświadczenia (str. 58, schemat 6 niepoprawnie zatytułowany „przygotowanie roślin do pomiaru”, nie można systemu korzeni nazywać układami korzeni !!, schemat jest zagmatwany) trudno wyliczyć jest termin.

Doktorant otrzymał tak bardzo interesujące wyniki, ale poza lakonicznym opisem brakuje podsumowania tych wyników.

## **Dyskusja**

To kolejna część dysertacji licząca 17 stron. Jest to rozdział za który trzeba doktoranta pochwalić. Wyniki uzyskane w przeprowadzonych wielopłaszczyznowo badaniach są przeanalizowane na tle licznych danych zacytowanych w tekście i zebranych w bardzo obszernym spisie literatury. Dyskusja została przeprowadzona inaczej niż kolejność prezentowanych wyników i dobrze, bo „bohaterem nr 1” tej rozprawy jest białko *McGLP-BIS* kryształki lśniącej. Ten rozdział chociaż również skażony sformułowaniami typu „ekspresja wielu GLP”, „w doświadczeniach nad kiełkowaniem”, „wydajność kiełkowania roślin”, „wybrane rodzaje GA”, „narządy fotosyntezy” itp.

Te wszystkie niedoskonałości, nie zakłócają śledzenia informacji w tym rozdziale, **bo jest najlepiej napisanym rozdziałem w rozprawie**. Przedyskutowanie nowych, niezwykle cennych wyników z danymi innych autorów i wyciągnięcie odpowiednich wniosków co do potrzeby dalszych badań pozwalających na głębsze poznanie procesów i mechanizmów kontrolowanych przez analizowane białko świadczy o dużych predyspozycjach Doktoranta do pracy naukowej.

### Wnioski

Ten fragment pracy obejmuje 6 wniosków w tym 5 i 6 są rozbudowane, niektóre są wynikowe np.2 i 4.

Ad 1. Co to znaczy: ekspresja genu jest regulowana rozwojowo?

Ad 4. Jak ekspresja może wpływać „na cechy fizjologiczne”?

### Spis literatury

Obejmuje on aż 322 pozycje, i tylko z wyjątkiem podręcznika polskiego, pozycje anglojęzyczne. Są w nim usterki typu nazwy czasopism; raz wszystkie człony tytułu czasopisma pisane dużymi literami, raz dużymi i małymi np. Plant Physiology poz. 98 i poz.119 oraz 126 (Plant physiology).

W konkluzji pragnę stwierdzić, że praca doktorska mgr. Jakuba Bizana stanowi ogromny wkład w poznanie białka *McGLP-BIS* u kryształki lśniącej, jego lokalizacji oraz roli w różnych procesach fizjologicznych i biochemicznych u roślin. Doktorant wykazał się nie tylko dużymi umiejętnościami w stosowaniu technik kultur *in vitro*, metod molekularnych, bioinformatycznych, fizjologicznych i biochemicznych, ale także szeroką wiedzą teoretyczną, która pozwoliła na wnikliwe przedyskutowanie uzyskanych wyników. Krytyczne komentarze i uwagi zamieszczone powyżej nie wpływają na moją wysoką ocenę wartości merytorycznej pracy. Wierzę, że Doktorant weźmie pod uwagę powyższe uwagi podczas przygotowania publikacji, które powinien wysłać do czasopism o wysokim Impact Factor.

### Wniosek końcowy

Wobec powyższego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr. Jakuba Bizana do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Ponadto biorąc pod uwagę szerokie spektrum zastosowanych nowoczesnych metod badawczych oraz wysoką wartość naukową otrzymanych wyników wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

  
Ewa Kępczyńska