

Prof. dr hab. inż. Iwona Żur
Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego*
Polska Akademia Nauk w Krakowie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Bizana pt.

„Rola białka germinopodobnego z *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) w rozwoju i odpowiedzi na stresy środowiskowe”

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl badań dotyczących korzeniowo-specyficznego białka germinopodobnego (McGLP-BIS), zidentyfikowanego u *Mesembryanthemum crystallinum*, o nieznanej dotychczas funkcji i hipotetycznej lokalizacji komórkowej.

Mesembryanthemum crystallinum jest gatunkiem modelowym, interesującym ze względu na umiejętność przechodzenia z metabolizmu typu C3 na CAM i wynikającej z tego wysokiej tolerancji na stresy środowiskowe. Możliwość przeprogramowania sposobu wiązania CO₂ skutkuje bowiem wysoce efektywną gospodarką wodną, co zapewnia przewagę konkurencyjną w warunkach wysokiej temperatury i ograniczonej dostępności wody. Niestety, istotnym ograniczeniem w pracach nad identyfikacją genów i ich rolą w tolerancji na stres, wykorzystujących jako obiekt badań *M. crystallinum* jest brak efektywniej metody transformacji genetycznej. Dlatego też, potwierdzenie biologicznej funkcji analizowanego białka uzyskano na drodze ekspresji heterologicznej – transformacji roślin *Arabidopsis thaliana* prowadzącej do nadekspresji badanego genu (*McGLP-BIS*).

Identyfikacja genetycznego i fizjologicznego podłoża tolerancji na stresy środowiskowe jest niezwykle istotna w obliczu zagrożeń związanych z globalnym ociepleniem i postępującym zanieczyszczeniem środowiska naturalnego. Co więcej, uzyskane wyniki mogą mieć aspekt praktyczny, prowadząc do opracowania metod ulepszania innych, ważnych gospodarczo gatunków roślin użytkowych, poprzez tradycyjne programy hodowli lub metody biotechnologiczne. Dlatego też, tematykę podjętą w niniejszej pracy uważam za istotną, zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i aplikacyjnych.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Roberta Koniecznego. Rozprawa składa się z dziesięciu rozdziałów, liczących w sumie 148 stron i obejmujących standardowe elementy tego typu prac naukowych: wstęp, cel pracy i hipotezy badawcze, opis materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników, dyskusję i wnioski. Załączono również opis dalszych planów badawczych, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis cytowanej literatury. Do tekstu dołączono 32 tabele, 30 rycin i 14 fotografii dokumentujących uzyskane wyniki. Układ pracy jest poprawny pod względem formalno-metodycznym, a tytuł adekwatny do przedmiotu badań. Na podkreślenie zasługuje również poprawna polszczyzna, jaką posługuje się Autor rozprawy oraz bardzo staranna oprawa graficzna - liczne plansze fotograficzne i grafiki obrazujące przebieg eksperymentów i uzyskane wyniki.

Ocena merytoryczna

Wstęp pracy rozpoczął od opisu struktury i funkcji germin oraz białek germinopodobnych, do których należy białko będące przedmiotem badań. Kolejne rozdziały poświęcono szczegółowej charakterystyce *M. crystallinum*, gatunku będącego obiektem badań i *Arabidopsis thaliana* - rośliny modelowej, wykorzystanej do walidacji biologicznej funkcji analizowanego białka. Następnie przedstawiono informacje dotyczące podstawowych roślinnych regulatorów wzrostu: auksyn, cytokinin i giberelin oraz przegląd literatury dotyczący ich zaangażowania w adaptację roślin do warunków stresowych. Kończącą część Wstępu poświęcono na opis procesu fotosyntezy, zakłóceń wywoływanych deficytem wody oraz konsekwencji związanych z generowaniem reaktywnych form tlenu i stresem oksydacyjnym. Przedstawiono również funkcje poszczególnych elementów systemu antyoksydacyjnego, w skład którego wchodzi m. in. białka germinopodobne o aktywności dysmutazy nadadtlenkowej. Rozdział ten dobrze uzasadnia celowość podjętych badań, został przedstawiony w sposób jasny i w większej części wyczerpujący. Do nielicznych wyjątków należy brak informacji o zróżnicowaniu mechanizmu i przebiegu fotosyntezy typu C3 i CAM, przez co wykorzystanie zawartości jabłczanu, jako znacznika typu fotosyntezy nie zostało uzasadnione (w tym miejscu chciałabym poprosić Doktoranta o odnośne wyjaśnienia). Następnie, w opisie reakcji obronnych uruchamianych przy udziale germin oraz białek germinopodobnych, brakuje informacji o możliwych negatywnych konsekwencjach związanych z generowaniem nadtlenku wodoru (H_2O_2). Zostały one opisane dopiero w przedostatnim podrozdziale dotyczącym stresu oksydacyjnego i jego skutków. W rezultacie pozytywne i negatywne aspekty generowania H_2O_2 rozpatrzono oddzielnie w odległych częściach Wstępu, podczas gdy stanowią one dwie strony „medalu” oddziaływania tej samej molekuly.

Cel pracy i hipotezy badawcze scharakteryzowano poprawnie, aczkolwiek dość ogólnikowo, bez bardziej precyzyjnego odniesienia do specyfiki zastosowanego modelu badawczego.

W pracy zastosowano szeroki zakres technik analitycznych, począwszy do metod molekularnych, poprzez narzędzia bioinformatyczne i biotechnologiczne po analizy fizjologiczne, biochemiczne i morfologiczne. Opis stosowanych metod jest bardzo szczegółowy, co potwierdza sporą wiedzę teoretyczną Autora rozprawy i sugeruje praktyczną znajomość opisywanych technik i procedur laboratoryjnych. Jednak kolejność zestawienia hipotez badawczych i metod analitycznych jest nieprzemysłana. Rozdział rozpoczęto od przedstawienia warunków wzrostu i rozwoju roślin *A. thaliana* (w tym linii transgenicznej), następnie zamieszczono metodykę przygotowania konstruktów genowych, transformacji i analiz bioinformatycznych oraz opis analiz morfologicznych i fizjologicznych linii transgenicznej. Dopiero w końcowej części rozdziału zamieszczono badania przeprowadzone na roślinach *M. crystallinum*. Bardziej logiczna byłaby sekwencja prowadząca od analiz mających na celu określenie struktury białka i jego roli u *M. crystallinum*, poprzez sporządzenie konstruktów i opis metody transformacji, kończąc opisem efektów nadekspresji genu u linii transgenicznej. Niestety, nie zamieszczono schematu eksperymentu mającego na celu identyfikację roli genu *McGLP-BIS* u roślin rosnących w warunkach deficytu wody. Brak również wskaźników charakteryzujących warunki wzrostu roślin i opisujących stan uwodnienia tkanek roślin (np. zawartości wody w podłożu, zawartości wody w tkankach liści czy potencjału osmotycznego). Pojawiająca się dopiero w opisie wyników informacja o pomiarach wykonywanych „...po 9 dniach niepodlewania roślin...” nie pozwala na określenie intensywności stresu, który zależy m.in. od właściwości podłoża, temperatury czy niedosytu wilgotności powietrza. W rozdziale tym wątpliwości budzi również opis pomiaru ilości nasion, który sugeruje raczej pomiar masy nasion z pojedynczej rośliny.

Dość nieoczekiwane jest też zróżnicowane podejście do analizy endogennego poziomu substancji wzrostowych. Dlaczego zawartość endogennych cytokinin i giberelin zmierzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas wyrażając je w wartościach bezwzględnych, a zmiany endogennej auksyny określono na podstawie analizy ekspresji genów związanych z biosyntezą kwasu indolilo-3-octowego i transportem wewnątrzkomórkowym? Nie odzwierciedla to rzeczywistej zawartości IAA, ani tym bardziej nie informuje o zawartości występujących w tkankach pochodnych IAA czy innych form auksyn. Szkoda również, iż pomiary ograniczono do roślin rosnących w optymalnych warunkach wzrostu, nie uwzględniając materiałów rosnących w warunkach deficytu wody. Podobnie szkoda, iż analizę systemu antyoksydacyjnego ograniczono do pomiaru aktywności jednego tylko enzymu – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD).

Przebieg eksperymentów i uzyskane wyniki zostały prawidłowo zweryfikowane z wykorzystaniem standardowych metod analizy statystycznej i przedstawione w postaci licznych tabel, rycin i fotografii.

Uzyskane wyniki analiz bioinformatycznej i filogenetycznej miały na celu określenie sekwencji aminokwasowej i modelu przestrzennej struktury badanego białka oraz poziomu

homologii strukturalnej i pokrewieństwa w stosunku do innych białek germinopodobnych. Sekwencjonowanie analizowanego genu wykazało obecność dodatkowego nukleotydu w stosunku do sekwencji zdeponowanej w bazie danych, skutkującą zmianą sekwencji aminokwasowej i skróceniem długości kodowanego białka (McGLP-BIS). Analiza filogenetyczna wykazała wysokie pokrewieństwo w stosunku do innych białek germinopodobnych występujących u roślin z różnych grup systematycznych oraz wysoki stopień homologii strukturalnej z globuliną zapasową 7S. Z dużym prawdopodobieństwem wykazano, iż McGLP-BIS jest białkiem wydzielniczym. Eksperymenty przeprowadzone na *M. crystallinum* wykazały, iż badane białko uczestniczy w rozwoju korzeni, liści i pędów, a poziom ekspresji genu *McGLP-BIS* rośnie wraz z wiekiem rośliny i jest uzależniony od obecności auksyny.

Wśród uzyskanych transgeniczných linii *A. thaliana* z wprowadzonym konstruktem genowym zawierającym sekwencję kodującą białko mcGLP-BIS, zidentyfikowano linię 3C wykazującą stabilną ekspresję, zlokalizowaną głównie w rejonie apoplastu oraz w przestrzeniach międzykomórkowych. Punktową, rozproszoną fluorescencję wykazano również w obrębie cytoplazmy, zwłaszcza wokół jądra komórkowego. Linię 3C wykorzystano jako obiekt modelowy w dalszych badaniach morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych prowadzonych na roślinach rosnących w warunkach optymalnego nawadniania oraz w warunkach deficytu wody. Analiza szeregu parametrów morfologicznych wykazała, iż rośliny linii 3C charakteryzowały mniejsze rozmiary nasion, ale prawie dwukrotnie wyższa liczba włośników u 7-dniowych siewek i ponad dwukrotnie większa liczba rozgałęzień pędu po 6 tygodniach wzrostu, w stosunku do roślin typu dzikiego (WT). Analiza podłoża hormonalnego wykazała, iż zróżnicowanie pomiędzy roślinami 3C oraz WT dotyczyło głównie poziomu ekspresji genu regulującego biosyntezę i transport IAA oraz zawartość giberelin GA₁ i GA₃. Ponadto, rośliny transgenicznej linii 3C nie wykazywały wyraźnych morfologicznych i fizjologicznych objawów deficytu wody występujących u roślin WT m. in. spadku zawartości chlorofilu i wzrostu zawartości antocyjanów, redukcji biomasy i spadku średnicy rozety liściowej oraz zaburzeń w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego skutkującymi spadkiem efektywności procesu fotosyntezy. Wyższy poziom tolerancji na stres suszy związany był z istotnie wyższą aktywnością SOD oraz stabilnym poziomem akumulacji H₂O₂. Czy Autor rozprawy może zaproponować możliwe hipotetyczne wyjaśnienie tego ostatniego wyniku tzn. dlaczego pomimo wzrostu aktywności SOD poziom akumulacji H₂O₂ nie uległ zmianie?

Większa część Dyskusji przeprowadzona została w sposób jasny, wyczerpujący i logiczny. Niestety, ze względu na zróżnicowaną metodykę analizy podłoża hormonalnego oraz ograniczenie pomiarów do roślin rosnących w optymalnych warunkach uwodnienia możliwość wyciągnięcia bardziej szczegółowych wniosków z tej części pracy jest ograniczona. Innym, wspomnianym powyżej, mankamentem pracy jest brak parametrów opisujących stan uwodnienia roślin rosnących w warunkach kontrolnych, zmian wywołanych okresowym deficytem wody oraz pomiarów aktywności enzymów antyoksydacyjnych lub/i antyoksydantów drobnocząsteczkowych zaangażowanych w rozkład H₂O₂. Powyższe dane

pozwołyby na bardziej precyzyjne określenie funkcji badanego genu w aklimacji roślin do warunków stresu.

Zestawione wnioski są poprawne, udokumentowane przedstawionymi w rozprawie wynikami, w ich świetle zamieszczone plany dalszych badań są uzasadnione. Streszczenie zawiera podsumowanie najważniejszych wyników, jest jednak podobnie jak opis metodyki nieco chaotyczne. Końcowa część rozprawy zawiera bardzo obszerny spis literatury obejmujący 322 pozycje, w dużej mierze z ostatniej dekady świadcząc o dobrym przygotowaniu merytorycznym Autora.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa Pana mgr Jakuba Bizana spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Uzyskane wyniki są oryginalne i pomimo pewnych mankamentów metodologicznych pozwoliły na określenie roli badanego genu jako zaangażowanego w rozwój roślin oraz adaptację do wzrostu w warunkach deficytu wody. Elementem nowości jest również wykazanie lokalizacji komórkowej analizowanego białka i potwierdzenie jego aktywności antyoksydacyjnej. W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Jakuba Bizana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 22. 09.2020 r.



Prof. dr. hab. Iwona Żur