



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU
Wydział Biologii

ul. K. Ciołkowskiego 1J, 15-245 Białystok
tel. 85 738-84-16, tel./fax 85 738-84-14



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Kupis „Molekularne aspekty oddziaływania kwasu abscysynowego na alternatywny szlak oddechowy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*)”

Rozprawa doktorska mgr Wiolety Kupis, doktorantki studiów doktoranckich Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Niewiadomskiej, w Zakładzie Biochemii i Genetyki Wydziału. Rozprawa jest opracowaniem napisanym w języku polskim. Doktorantka analizowała reakcje rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) na obniżenie intensywności promieniowania (imitujące warunki panujące jesienią) oraz dostarczenie kwasu abscysynowego do liści. Badała modyfikacje procesów starzeniowych i metabolicznych, z uwzględnieniem funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego i alternatywnej drogi oddechowej, określała także zmiany ekspresji genów kodujących alternatywną oksydazę w odpowiedzi na zastosowane warunki eksperymentalne.

Rozprawa doktorska mgr W. Kupis ma układ typowy - obejmuje 128 stron wydruku, w tym: *Wstęp* (35 stron), *Cel pracy* (1 strona), *Materiały i metody* (21 stron), *Wyniki* (22 strony), *Dyskusja* (8 stron). Rozprawa doktorska zaopatrzona jest także w streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy umieszczono spis ponad 230 pozycji cytowanego piśmiennictwa (w większości angielskojęzycznych prac oryginalnych).

Wstęp jest obszernym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Został on podzielony na pięć podrozdziałów, w których Doktorantka kolejno charakteryzuje: procesy metaboliczne zachodzące w mitochondriach, budowę mitochondriów, funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów ze szczególnym uwzględnieniem alternatywnego szlaku oddechowego oraz roli oksydazy alternatywnej (AOX), omawia także poznane geny kodujące AOX. Następnie przedstawia budowę i funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego, strukturę fotosystemów (PSI i PSII), opisuje etapy procesu fotosyntezy oraz właściwości chlorofilu, które zostały wykorzystane w technikach nieinwazyjnej oceny funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego (monitorowanie kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*). Kolejny podrozdział

dotyczy szlaków łączących metabolizm mitochondrialny z chloroplastowym i zawiera szczegółowe omówienie procesu fotooddychania a także omówienie funkcjonowania wymiany jabłczan/szczawiooctan (MA/OAA) - dzięki odpowiednim przenośnikom błonowym (OMT) oraz aktywności dehydrogenaz jabłczanowych (MDH) i różnorodnej lokalizacji ich izoform. Następnie Doktorantka przedstawia hormony stresowe roślin a szczegółowo charakteryzuje kwas abscysynowy: strukturę, biosyntezę, funkcje, geny regulowane przez ABA, udział w szlakach transdukcji sygnału a także proces inaktywacji ABA w tkankach roślinnych. Kolejny podrozdział poświęcony jest procesom związanym ze starzeniem się liści oraz roli reaktywnych form tlenu (RFT) w tym zjawisku - zostały więc omówione pokrótce powstawanie i rodzaje RFT w komórkach roślinnych a także mechanizmy usuwania ich nadmiaru. Uważam, że zaprezentowane treści oraz przegląd aktualnej literatury dobrze wprowadzają w tematykę naukowych zainteresowań Doktorantki. We Wstępie umieszczono sześć schematów oraz jedną tabelę, z wykazem wybranych parametrów fluorescencji chlorofilu *a* stosowanych do oceny kondycji fotoukładu PSII. Ryciny przedstawiają kolejno: schematyczny przebieg mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, krzywe wzbudzenia fluorescencji chlorofilu *a* oraz typowe widmo fluorescencji PAM (z indukcją i relaksacją NPQ). Następne ryciny prezentują etapy procesu fotooddychania, lokalizację dehydrogenaz jabłczanowych, przenośników jabłczanu i szczawiooctanu oraz wymianę siły redukcyjnej pomiędzy przedziałami komórkowymi, a ostatnia – budowę cząsteczki kwasu abscysynowego. Uważam, że Wstęp zawiera wszystkie istotne informacje związane z tematyką rozprawy doktorskiej i uwzględnia najważniejsze pozycje piśmiennictwa. Nie mam wielu uwag krytycznych do tego rozdziału. Nasuwają się jedynie drobne sugestie, np. uważam że czcionka stosowana w opisach na schematach powinna być znacząco większa – dotyczy to zwłaszcza Ryciny 4 i 5 (podpisy są nieczytelne). Ponadto uważam, że pod każdym schematem powinien znajdować się spis użytych skrótów (str. 10, 24, 31, 36). We Wstępie znaleziono wiele drobnych błędów literowych i stylistycznych (np. str. 8, 17, 21, 28-38, 41-43).

Cel recenzowanej rozprawy doktorskiej został sprecyzowany jako cyt.: „weryfikacja hipotezy zakładającej, że zależna od ABA adaptacja do stresu związanego z przygotowaniem roślin do sezonu zimowego polega na aktywacji alternatywnego szlaku oddechowego”. Doktorantka postawiła cztery główne zadania badawcze, które posłużyły do weryfikacji tej hipotezy. Postanowiła zbadać: i) udział ABA w starzeniu się liści, ii) parametry stresu oksydacyjnego wywołanego pogorszeniem warunków świetlnych (i traktowaniem liści ABA), iii) wpływ ABA na aktywność alternatywnego szlaku oddechowego, vi) zmiany ekspresji genów kodujących oksydazę alternatywną po dostarczeniu liściom ABA (i H₂O₂). Analizując dalsze

rozdziału rozprawy doktorskiej mgr W. Kupis, można stwierdzić, że cel pracy został w większości zrealizowany.

Stosowany w pracy materiał roślinny, układ eksperymentalny i metody badań nie budzą zastrzeżeń. Rozdział Materiał i metody, podzielony na 14 podrozdziałów, zawiera szczegółowe informacje wystarczające do ewentualnego powtórzenia przedstawionych doświadczeń. Dobór metod badawczych jest w miarę różnorodny, zastosowano nowe techniki badawcze. Warunki wzrostu *A. thaliana*, użytego jako materiał badawczy, zostały opisane prawidłowo. Sposób traktowania egzogennymi roztworami ABA i H₂O₂ został także scharakteryzowany. Pokróćce opisano sposób oceny starzenia liści (DIS, j. ang. *dark induced senescence*). Fluorescencję chlorofilu *a* mierzono za pomocą fluorymetru Imaging-PAM (M-Series, Heinz Walz GmbH, Niemcy). Ponadto wykonano pomiary widma fluorescencji niskotemperaturowej (77K) z zastosowaniem spektrofluorymetru (LS50B, Perkin Elmer). Doktorantka opisała pomiary natężenia oddychania mitochondrialnego - z wykorzystaniem kalorymetru izotermicznego TAM III (oprogramowanie TAM, Thermometric, Szwecja) oraz szacowanie natężenia cyjanoodpornej alternatywnej drogi oddechowej. Część opisanych badań wykonała w ramach stażu w Zakładzie Biologii Stresu Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* PAN w Krakowie. Doktorantka przedstawiła ponadto spektrofotometryczną analizę aktywności enzymu antyoksydacyjnego, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), poprzez oszacowanie stopnia redukcji cytochromu *c* przez anionorodnik ponadtlenkowy (produkowany z ksantyny w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową). Doktorantka badała także zmiany ekspresji genów kodujących oksydazę alternatywną (*AOX1A*, *AOX1B*, *AOX1C*, *AOX1D*, *AOX2*) i czynniki transkrypcyjne (*ANAC017*, *ABI4*) oraz genów starzenia (*WRKY53*, *SAG12*) - z zastosowaniem techniki RT-PCR, stosując jako geny referencyjne *ACT2* i *UBI10*. Do izolacji RNA z liści rzodkiewnika zastosowała i opisała trzy różne metody: i) kit do izolacji wykorzystujący kolumny z filtrami krzemionkowymi do wiązania kwasów nukleinowych, ii) metodę Chomczyńskiego i Sacchi (1987) z buforem ekstrakcyjnym zawierającym tiocyjanian guanidyny, iii) bufor ekstrakcyjny zawierający CTAB i wytrącanie RNA przy użyciu chlorku litu. Po izolacji oczyszczała próbki z DNA, oceniała czystość preparatów RNA, w tym stosując elektroforezę agarozową. Na podkreślenie zasługuje widoczne zaangażowanie Doktorantki w opracowanie i optymalizację metod izolacji RNA i warunków reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-qPCR). Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Nasuwają się pewne uwagi do tego rozdziału: w niektórych opisach doświadczeń brakuje odnośników do literatury metodycznej (str. 47, 51, 55), Ryciny 8 i 10 są słabej jakości, mało widoczne, a analiza statystyczna została opisana zbyt skrótowo. Obszerną część rozdziału Materiał i metody zajmuje

opis zoptymalizowania metody RT-PCR do badań ekspresji genów w liściach rzodkiewnika (traktowanych egzogennymi związkami) - uważam, iż część przedstawionych wyników doświadczeń można by umieścić w następnym rozdziale - jako wyniki wstępne. Analiza rozdziału Materiał i metody, łącznie z prezentowanymi w następnej części rozprawy wynikami, pozwala stwierdzić, że mgr W. Kupis opanowała metody badań stosowane obecnie w biologii eksperymentalnej roślin.

Rozdział Wyniki Doktorantka podzieliła na sześć podrozdziałów opisując kolejno: zmiany w starzeniu liści powodowane obniżeniem intensywności stosowanego oświetlenia oraz traktowaniem ABA, wybrane parametry fluorescencji chlorofilu *a* wskazujące na kondycję aparatu fotosyntetycznego po traktowaniu liści ABA oraz zmianach intensywności promieniowania. Następnie zostały zaprezentowane wyniki szacujące aktywność alternatywnego szlaku oddechowego, dzięki pomiarom emisji ciepła z liści oraz aktywność SOD. W kolejnym etapie badań Autorka przeprowadziła analizę profilu ekspresji genów kodujących oksydazę alternatywną, zaprezentowała względną ekspresję *AOX1A* i *AOX1D* oraz *ANAC017*, przedstawiła również ekspresję *WRKY53*, w warunkach kontrolnych lub po traktowaniu ABA. Ostatni podrozdział poświęcony został ocenie udziału H_2O_2 w modyfikacji tempa starzenia liści i ekspresji genów kodujących AOX. Należy stwierdzić, że opis uzyskanych wyników badań w rozprawie doktorskiej mgr W. Kupis jest poprawny i logiczny. Rozdział ten zawiera 20 rycin, wykresy (w większości słupkowe) są zrozumiałe i opatrzone odpowiednim opisem. Po fragmentach omówienia wyników są cytowane (i przedstawiane) odpowiednie ryciny. Sposób przedstawienia i opis wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej nie budzą większych zastrzeżeń. Należy jednak żałować, iż nie zaprezentowano podstawowej charakterystyki materiału roślinnego - wybranych parametrów wzrostowych, oceny zawartości wody w tkankach liści (np. RWC). Oceniając poziom stresu oksydacyjnego oraz traktując liście roztworem H_2O_2 należałoby także monitorować poziom tego związku w tkankach.

W ramach pracy doktorskiej mgr W. Kupis weryfikowała hipotezę badawczą, która zakłada, że dostosowanie roślin do zimowego sezonu jest związane z aktywacją oksydazy alternatywnej, mitochondrialnego enzymu, który jednocześnie uczestniczy w redukcji wytwarzania RFT. Doktorantka uzyskała wyniki wskazujące na zwiększenie ekspresji dwóch genów kodujących AOX, co po części może wspierać testowaną hipotezę. Jednak nie uzyskała danych wskazujących na zwiększoną aktywność alternatywnego szlaku oddychania, przy zastosowaniu mikrokalorymetru. Być może należałoby to sprawdzić z zastosowaniem innych metod, np. z użyciem elektrody tlenowej (gdyż dostęp do bardziej precyzyjnych technik pomiaru cyjanoodpornej drogi oddechowej, wykorzystujących zróżnicowany stopień dyskryminacji

pobierania izotopu tlenu przez oksydazę cytochromową i alternatywną jest ograniczony). Aktywność szlaku z udziałem AOX wydaje się być zależna od intensywności światła. Doktorantka wskazała, że jeden gen, *AOX1D*, spośród badanych genów kodujących AOX, był indukowany przez dostarczenie H_2O_2 do liści (powodujące prawdopodobnie podwyższony poziom nadtlenu wodoru w tkance). Do ciekawych wyników rozprawy doktorskiej mgr W. Kupis należy zaliczyć obserwację, że traktowanie roślin hormonem stresowym - ABA wpływa na pewne opóźnienie starzenia liści, potwierdziły to niektóre parametry fluorescencji chlorofilu *a* wskazujące na kondycję PSII (F_v/F_m). Interesujący wydaje się także zależny od ABA spadek aktywności dysmutazy nadadtlenkowej w liściach. Wyniki przedstawione w rozprawie zostały już częściowo opublikowane (*Biologia Plantarum* 2020).

Dyskusja jest zwięźle napisanym rozdziałem rozprawy doktorskiej. Mgr W. Kupis przeanalizowała wyniki badań własnych oraz porównała je z danymi z literatury. Doktorantka podjęła próbę objaśnienia roli ABA w procesie starzenia liści. Przeprowadziła także przegląd danych o zastosowanych parametrach fluorescencji chlorofilu *a* i ich wykorzystaniu w badaniach oddziaływań różnych stresów na rośliny. Kolejna część dotyczy metabolizmu mitochondrialnego oraz udziału RFT w procesie starzenia, poruszane są też możliwe interakcje RFT z ABA, a także rola SOD. Ostatnia część Dyskusji to krótka próba wyjaśnienia obserwowanych zmian poziomu ekspresji genów kodujących AOX i ANAC017 w zastosowanym wariantcie eksperymentalnym. Wiemy, że nie zawsze obserwowanym zmianom ekspresji genów towarzyszą odpowiednie zmiany poziomu białek i ich aktywności - czy Doktorantka miała w planach oszacowanie poziomu białka AOX? Czy takie badania były już wykonane w warunkach zbliżonych do zastosowanych? Należałoby uzupełnić dyskusję o te aspekty, np. w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Uważam, że na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka powinna sformułować wnioski (nawiązujące do postawionych celów pracy) i umieścić je po rozdziale Dyskusja. Nie nasuwa się wiele uwag krytycznych dotyczących rozdziału Dyskusja. Generalnie własne osiągnięcia Doktorantki są podkreślone w odpowiednim stopniu, nie znikają na tle danych literaturowych. Uważam, że cytowanie własnych rycin, w niektórych miejscach, ułatwiłoby czytanie tekstu Dyskusji (np. str. 89-90, 93). Zabrakło także cytowań publikacji polskich zespołów badających cyjanoodporną drogę oddechową, np. pracy przeglądowej autorstwa Szal B. i Rychter A. „Oksydaza alternatywna – niedokończona opowieść” opublikowanej w *Postęпах Biochemii* w 2016 roku. Przydatny byłby również schemat podsumowujący otrzymane dane doświadczalne i wątki pracy (ewentualnie wskazujący możliwe mechanizmy). Chciałabym, by mgr W. Kupis szerzej omówiła warunki i procesy towarzyszące hartowaniu roślin do warunków jesienno-zimowych, np. podczas obniżania temperatury czy

skrócenia fotoperiodu. Oczekuję także wskazania, na obronie rozprawy doktorskiej, które badania warto by było rozszerzyć i kontynuować w przyszłości.

Rozprawa doktorska mgr Wiolety Kupis jest w większości napisana poprawnym językiem, bez poważnych błędów. Rozprawa jest prawidłowo zredagowana, prawidłowo cytowane są prace innych autorów a spis literatury jest ujednolicony. Znalezione jednak pewne niedociągnięcia, np. brakuje wyjaśnienia skrótów pod niektórymi schematami (str. 24, 31, 66). Stwierdzono liczne drobne błędy literowe (i interpunkcyjne) we wszystkich rozdziałach rozprawy (np. str. 8, 17, 21, 28, 29, 30, 33, 37, 38, 41, 42, 43, 47, 50, 88, 92, 93, 98, 99, 101, 102, 107, 108), znaleziono pewne „niezręczności” językowe i stylistyczne (np. str. 46, 43, 68, 72 „pryskanie ABA”). Doktorantka, stosując przedstawiony układ eksperymentalny powinna używać pojęcia „aklimatyzacja” lub „hartowanie” roślin a nie „adaptacja” (str. 44, 125). W pracy brakuje podrozdziału Podsumowanie lub Wnioski. Wymienione uwagi nie wpływają jednak na wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej. Stwierdzam, że Doktorantka opanowała problematykę i metodykę badań z zakresu fizjologii i biochemii roślin, wykazała się znajomością zagadnień i terminologii naukowej, potrafiła zorganizować i zaplanować doświadczenia oraz zinterpretować uzyskane wyniki.

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że moje krytyczne uwagi mają charakter dyskusyjny, nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej mgr Wiolety Kupis. Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy, opanowała współczesne metody badawcze, uzyskane wyniki są oryginalne. Stwierdzam, jako recenzent, że **praca doktorska mgr Wiolety Kupis** zatytułowana: **Molekularne aspekty oddziaływania kwasu abscysynowego na alternatywny szlak oddechowy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*)** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występuję do **Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Wiolety Kupis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Białystok, 2.04.2020 r.

Prof. dr hab. Iwona Cierieszko

*Pracownia Fizjologii Roślin
Katedra Biologii i Ekologii Roślin
Wydział Biologii
Uniwersytet w Białymstoku*