



Kraków, 15 października 2019 r.

dr hab. Piotr Rozpądek

Małopolskie Centrum Biotechnologii, UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ernesta Skowrona

pt. „Fizjologiczne i molekularne podstawy inhibicji starzenia liści *Hordeum vulgare* L. w odpowiedzi na traktowanie cytokininami”

Promotor: prof. dr hab. Ewa Niewiadomska

Rozprawa doktorska mgr Ernesta Skowrona zatytułowana „Fizjologiczne i molekularne podstawy inhibicji starzenia liści *Hordeum vulgare* L. w odpowiedzi na traktowanie cytokininami” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Niewiadomskiej posiada klasyczny układ ze wstępem, metodyką, opisem wyników i dyskusją. W swojej Pracy Pan mgr Ernest Skowron wykorzystał trzy odmiany jęczmienia do opisanie różnic w indukcji DIS (ang. *dark induced senescence*) oraz hamującego DIS efektu wybranych cytokinin. Proces starzenia był opisywany na podstawie degradacji chlorofilu i zmian funkcji aparatu fotosyntetycznego.

Wstęp: Jest bardzo obszerny: 73 strony tekstu. Autor w sposób wnikliwy i drobiazgowy potraktował opis cytokinin, ich metabolizmu i roli w fizjologii roślin. Z całą pewnością, wstęp do rozprawy może posłużyć jako podstawa do niezależnej monografii traktującej o roli cytokinin w regulacji procesów życiowych roślin. Zanim jednak tak się stanie Doktorant powinien popracować nad stosowaniem specjalistycznej terminologii w swoich tekstach. W rozprawie regularnie pojawiają drobne nieścisłości. Jako przykład może posłużyć str 12: enzym może katalizować a nie nadzorować. W rozprawie doktorskiej wstęp powinien być krótszy, ograniczony wyłącznie do treści niezbędnych do wyjaśnienia czytelnikowi celu i zakresu badań opisanych w dysertacji. Szczególny nacisk powinien zostać położony na zagadnienia związane z rolą cytokinin w regulacji starzenia i fotosyntezy. Fragment wstępu dotyczący tych aspektów oddziaływania cytokinin oceniam wysoko.

Uwagi:

1. Str 13 Dotyczy raczej DNA a nie RNA?
2. Str 15 (między innymi) Obszerne opisy inżynierii genetycznej (szczególnie w ujęciu historycznym), łącznie z opisem plazmidów wykorzystywanych w transformacji są niepotrzebne.

Cel badań: Podstawowy cel badań sformułowany został następująco: „... Głównym celem zrealizowanych badań było dostarczenie nowych informacji dotyczących fizjologicznych i molekularnych podstaw opóźnienia procesu starzenia liści w wyniku oddziaływania

cytokinin...” W jakim celu planowano dostarczenie nowych informacji? Dostarczenie nowych informacji nie może być celem samym w sobie. Informacje powinny służyć określonej celowi. W moim przekonaniu doktorant powinien jasno uzasadnić znaczenie badań dotyczących starzenia liści jęczmienia i roli egzogennych cytokinin w tym procesie. W celach szczegółowych doktorant wymienił analizy, które zostały wykonane bez określenia ich celu. W jakim celu wykonano analizę aktywności anty-starzeniowej cytokinin? A w jakim celu: „...Przeanalizowanie udziału wybranych elementów szlaku sygnałowego CK [fosfolipaza D, tlenek azotu (II), zewnątrzkomórkowa inwertaza] w anty-starzeniowej aktywności cytokinin...”

Dodatkowo, nie znalazłem w rozprawie doktorskiej mgr. Ernesta Skowrona jasno sformułowanych hipotez badawczych.

Metodyka: Metodyka wykorzystana do badań została opisana bardzo szczegółowo na 35 stronach rozprawy. Zaletą opisu są ilustracje (tabele, schematy), jak również przybliżenie czytelnikowi podstaw teoretycznych wykonanych analiz. Niewątpliwą wadą jest umieszczenie treści bardziej odpowiednich do Wstępu w tej części rozprawy. Jednym z licznych przykładów takiej organizacji tekstu jest opis gatunku rośliny (str. 85) użytej do badań. Informacje zawarte w tym opisie są niezwykle ważne z punktu widzenia uzasadnienia wykonanych badań, dlatego też rozdział ten powinien znajdować się we Wstępie pracy. Dodatkowo, w rozprawie występują drobne błędy językowe lub/i niepoprawnie zastosowana terminologia. Przykłady takich błędów wymienione zostały w moich uwagach do Metodyki.

Uwagi:

1. Str. 85 co to jest rozbudowany genom? Proszę unikać nic nie wnoszących i nieprecyzyjnych określeń.
2. Str. 86 rośliny były uprawiane przy $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dlaczego do uprawy użyto tak słabe światło? W spektroskopii nie ma pików są pasma. Autor używa określenia pik w odniesieniu do maksimum emisji światła. Jest to drobny błąd. W przyszłości proszę zwrócić większą uwagę na stosowaną terminologię. W opisie oświetlenia LED Autor używa określenia: „soczewki”. Proszę o wyjaśnienie. Nie wiedziałem, że w diodach wykorzystywane są soczewki. Opis źródła światła powinien zawierać informacje o spektrum i natężeniu. Szczegóły techniczne budowy naświetlaczy LED nie są potrzebne do odtworzenia doświadczenia.
3. Str. 87 Czy w odniesieniu do pracy Yamburenko doktorantowi chodzi o okołodobowe zmiany w ekspresji genów? Tu i w wielu innych miejscach w tekście brakuje precyzji w wypowiedzi. Ponadto, białko jest finalnym produktem procesu ekspresji genów (kodujących białka). Rozróżnianie pomiędzy „poziomem białka” a ekspresją genów jest więc nieścisłością, której należy unikać. W tym przypadku należy pisać o transkrypcji, a nie o ekspresji.
4. Str 92 Opis tabeli: budowa analizowanych cytokinin powinien brzmieć: budowa chemiczna.....
5. Str 93 Proszek liściowy=zhomogenizowane liście

6. Str 92 Pomiar indukowanej fluorescencji chlorofilu *a*. Opis jest zbyt obszerny. Nie ma potrzeby opisywania szczegółów analizy i urządzenia. Zaznajomienie czytelnika z analizą jest istotne i ułatwia percepcję tekstu, ale np. liczba diod emitujących światło niebieskie i inne szczegóły techniczne pomiaru są do zrozumienia treści niepotrzebne. Tym bardziej, że można je znaleźć w ogólnie dostępnych podręcznikach/instrukcjach konkretnych urządzeń. Ta uwaga dotyczy nie tylko opisu „Pomiar indukowanej fluorescencji chlorofilu *a*”, lecz również innych rozdziałów tej sekcji rozprawy. Opis metody należy dobrać tak, aby ułatwić czytelnikowi zrozumienie przeprowadzonych badań i umożliwić odtworzenie opisywanego doświadczenia.
7. Str. 95 Proszę wyjaśnić dlaczego analizowano krzywą świetlną i indukcyjną, uwzględniając kontekst badań.
8. Str 101 Homogenat liściowy (unikać sformułowania proszek) nie rozcieńczano w HEPES tak jak to opisał Autor tylko zawieszano w buforze.
9. Str 108 worteksowano=wytrząsano. Starować można wagę a nie próbki.
10. Str 109 Jeżeli dane nie są prezentowane to nie należy ich opisywać w materiałach i metodach, ewentualnie przenieść do suplementu. Coomasie nie stosuje się do barwienia rubisco. Proszę używać precyzyjnych sformułowań.
11. Str 112 Analiza WB. Co to znaczy, że próbki analizowano 4-krotnie. Dane nieprezentowane? Nie rozumiem?

Wyniki: Wyniki przeprowadzonych badań opisane zostały na 71 stronach. Większość danych została przedstawiona w formie wykresów słupkowych. Wykresy są czytelnie opisane; opisy zawierają wszystkie niezbędne informacje umożliwiające zrozumienie przedstawionych treści. Selekcja odmian do szczegółowych analiz zmian w funkcji i budowie aparatu fotosyntetycznego została opisana w sposób przejrzysty. Podstawową wadą tego rozdziału jest powtarzające się przeplatanie opisu wyników szczegółami metodologicznymi i dyskusją. Ponadto, nie jest jasne czy porównanie zawartości białek fotosystemów (i innych) metodą Western blot pomiędzy odmianami jęczmienia było analizowane statystycznie. Nie znalazłem takiej informacji w tekście, a wyniki są opisywane jako istotne?!

Uwagi:

1. Str 137-139 Ocena zmian w wydajności kwantowej PSII wywołanych starzeniem i *N*₆-benzyloadeniną (BA). Jaki był cel tych analiz? Przy odpowiedzi, proszę uwzględnić kontekst badań. Opis stanowi fragment instrukcji dotyczący mechanizmu wykorzystywanego w analizie. Szczegóły metodologiczne powinny być ograniczone do sekcji Metodyka.
2. Str 149 „...W przypadku próby kontrolnej dla odmian Carina i Lomerit maksima emisji odpowiadające PSII wyniosły odpowiednio 683,5 i 683 nm, natomiast dla PSI odpowiednio 739 oraz 738,5 nm, wskazując na pewne różnice w strukturze składowych obu fotoukładów występujące między odmianami (Ryc. 14a, b). Po 72 h inkubacji DIS bez BA u obu odmian zanotowano nieznaczne (0,5–1,5 nm) przesunięcie maksimum dla obu fotosystemów w kierunku fal krótszych (Ryc. 14a, b),

wskazujące na reorganizację struktur fotoukładów...” Czy rzeczywiście można to stwierdzić?! Nie znalazłem analizy statystycznej.

Dyskusja: Dyskusja jest zbyt obszerna (50 stron). Tak jak w poprzednich rozdziałach zawiera zbędne opisy wyników i metodyki. Jako przykład może posłużyć następujący opis z pierwszej strony dyskusji „...hormony były rozpuszczane w DMSO...” (str 193). W dyskusji powinna nastąpić analiza i synteza wyników oraz weryfikacja hipotez. Nie ma potrzeby szczegółowego omawiania wyniku każdej analizy, tym bardziej, że część wyników jest niekonkluzywna. Większa część dyskusji sprowadza się do porównania wyników analiz wykonanych na różnych odmianach jęczmienia oraz zestawienia różnic pomiędzy badanymi parametrami fluorescencji w oparciu o literaturę. Muszę przyznać, że Doktorant wykonał ogromną pracę próbując zinterpretować i wyjaśnić czytelnikowi zaobserwowane różnice w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego w analizowanym modelu badawczym. Łatwość, z jaką Autor objaśnia skomplikowaną materię fotosyntezy, sprawnie łącząc zjawiska na poziomie molekularnym z fizjologią rośliny, jest imponująca. Niestety, często brakuje wniosków z badań i odniesienia do tematu publikacji: starzenia. Przede wszystkim brakuje odpowiedzi na pytanie o rolę cytokinin w procesie starzenia w odniesieniu do zmian strukturalnych i funkcjonalnych aparatu fotosyntetycznego. Raz jeszcze należy podkreślić, że Doktorant bardzo wnikliwie zinterpretował wyniki analiz, szczególnie analiz wydajności transportu elektronów w PSI i PSII, jak również parametrów wymiany gazowej liści różnych odmian jęczmienia. Ponadto, wykonał ogromną pracę, porównując wyniki swoich badań z opublikowanymi wcześniej danymi. Dodatkowym mankamentem tej części rozprawy są liczne spekulacje i wyciąganie daleko idących wniosków na podstawie poszlak. Poniżej podaje dwa przykłady.

1. Str 221 Autor wysuwa nieuprawnione wnioski dotyczące przekształceń cukrowców w trakcie starzenia. Niepodważalnym faktem jest, że do takich zmian dochodzi, natomiast Autor zbyt daleko posuwa się w swoich spekulacjach. Analiza cukrów w materiale jest stosunkowo prosta i rutynowo wykonywana przez liczne laboratoria. Przed publikacją warto rozważyć wykonanie takich analiz.
2. Str 227 Spekuluje się, że synteza CK diametralnie różni się u różnych odmian. Nie ma do tego podstaw eksperymentalnych.

Podczas obrony sugeruję skupić się na wyjaśnieniu wyników w kontekście roli cytokinin w starzeniu liści jęczmienia i odpowiedzieć na pytanie: w jaki sposób opublikowane wyniki przyczynią się do głębszego zrozumienia procesów starzenia i udziału cytokinin w tych procesach. A także, w jaki sposób wyniki te mogą być wykorzystane w praktyce. W odniesieniu do dyskusji proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do następujących uwag:

1. Str 196 „...Odmiana Bursztyn, w przeciwieństwie do badanych pod kątem starzenia odmian Carina i Lomerit (Krupinska i in., 2012; Krieger-Liszkay i in., 2015) nie była analizowana i nie zidentyfikowano wcześniej cech fenotypu *stay-green*, ani mechanizmu odpowiedzialnego za obserwowane w badaniu opóźnienie procesu starzenia indukowanego przez DIS. Z dostępnych informacji wynika, że odmiana Bursztyn, charakteryzuje się średnią do niskiej efektywnością plonowania i została

wprowadzona do Krajowego Rejestru odmian jęczmienia ozimego COBORU w 2003 roku, ale aktualnie nie widnieje już na liście odmian. W Krajowym Rejestrze brak także jarej odmiany Carina, którą jako relatywnie dawno wprowadzoną do uprawy odmianę jęczmienia zastąpiono wyżej plennymi i bardziej odpornymi (Krupinska i in., 2012). Znajduje się na niej natomiast wpisana w 2002 roku odmiana Lomerit o wysokiej plenności (Leszczyńska i Noworolnik, 2005; Leszczyńska i Noworolnik, 2017). Bardzo proszę o wyjaśnienie tego fragmentu tekstu. Co oznacza usunięcie tych odmian z Krajowego Rejestru odmian jęczmienia i jakie ma to znaczenie w kontekście przedstawionych wyników?

2. Str 202 Czy według założeń spodziewano się, że różnice w dekompozycji fotosystemów są procesem spontanicznym czy kontrolowanym? Jeżeli kontrolowanym, to jaki jest cel tego procesu? Jakie jest jego mechanistyczne podłoże? W jaki sposób wyniki przedstawione w rozprawie ułatwią jego zrozumienie?
3. Str 203 Czy według założeń spodziewano się, że cytokininy będą hamować starzenie, nie oddziałując jednocześnie na degradację chlorofilu i rozpad anten. Czy może szukano cytokinino-zależnego mechanizmu utrzymania integralności aparatu?
4. Str 205 Czy jedną z cech fenotypu stay green może być kolejność degradacji białek fotosystemów? Jakie to ma znaczenie w kontekście DIS?
5. Str 217 Jaki był cel analizy wymiany gazowej liści?
6. Str 232 Proszę o wyjaśnienie: SNP nie hamuje degradacji chlorofilu, ale pozwala utrzymać wydajność przepływu elektronów w PSII (przy znaczących stratach chlorofilu)?

Recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Ernesta Skowrona pt: "Fizjologiczne i molekularne podstawy inhibicji starzenia liści *Hordeum vulgare* L. w odpowiedzi na traktowanie cytokininami" wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Ewy Niewiadomskiej (1) została poprawnie przygotowana pod względem metodycznym. Godne uznania jest zastosowanie przez Doktoranta licznych, różnorodnych technik analitycznych. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury i wystarczającą umiejętnością interpretacji pozyskanych wyników.

Rozprawa doktorska mgr Ernesta Skowrona spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim, wynikającym z Ustawy z dnia 14 marca roku 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz 595, z późniejszymi zmianami), w związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Piotr Rozpądek

dr hab. Piotr Rozpądek