

Recenzja
Rozprawy doktorskiej pani mgr Edyty Łukaszuk
p.t. „Reakcje rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana* L.)
na uszkodzenia mechaniczne”
wykonanej na Wydziale Biologiczno-Chemicznym
Uniwersytetu w Białymstoku

Ze względu na brak możliwości przemieszczania się rośliny wykształciły bardzo skomplikowany system reakcji na liczne stresy środowiskowe, z którymi muszą zmierzyć się *in situ* – i przeżyć. Z punktu widzenia człowieka, użytkownika roślin, istotna jest nie tylko zdolność przeżycia ale także kondycja rośliny i jej produktywność. Stąd podejmowane są liczne próby modyfikacji mechanizmów reakcji roślin na stres. Powodzenie tych prób zależy w sposób oczywisty od zrozumienia ścieżki metabolicznej lub/i sygnałowej którą chcemy zmodyfikować, co jest warunkiem koniecznym skuteczności proponowanych procedur i umożliwi przewidzenie wszystkich konsekwencji jakie może nieść wprowadzona modyfikacja. Pani mgr Edyta Łukaszuk wybrała jako temat swoich badań różne aspekty stresu mechanicznego. Stres ten może powstać na skutek działania czynników abiotycznych ale wchodzi także w zakres stresów biotycznych. Wybór tematu pracy doktorskiej uważam za bardzo trafny ale też bardzo trudny, nie tylko ze względu na skomplikowaną istotę samych zagadnień lecz także z uwagi na ich popularność. Skalę problemu obrazuje prosty przykład: po umieszczeniu w przeglądarce internetowej hasła „plant, stress, wounding” i ustawieniu limitu czasowego na rok 2015 otrzymałam listę 15100 publikacji. Ogrom faktów i interpretacji zawarty w tych publikacjach niesie za sobą nieuchronnie także pewien szum informacyjny. Dlatego uważam za bardzo cenną inicjatywę podjęcie próby systematycznego i wielostronnego zbadania wybranych aspektów stresu mechanicznego zarówno pod kątem oceny skutków metabolicznych jak i identyfikacji potencjalnych szlaków sygnałowych zaangażowanych w odpowiedź rośliny.

Formalny opis rozprawy

Praca liczy 150 stron maszynopisu, w tym zamieszczony na początku spis treści i wykaz stosowanych skrótów oraz, na końcu, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz kilkunastu rysunek.

Rozprawa ma klasyczny układ. *Wstęp* obejmujący 29 stron tekstu został napisany jasno i rzeczowo. Po ogólnym omówieniu reakcji roślin na czynniki stresowe autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy dotyczący mechanizmów obronnych roślin uruchamianych w przypadku zranienia ze szczególnym uwzględnieniem roli w tej obronie hormonów i regulatorów wzrostu, cukrów i ich przemian oraz reaktywnych form tlenu. Zawarte we *Wstępie* informacje są pomocne do właściwej analizy wyników przedstawionych w rozprawie. Jako osobny rozdział wyodrębniony został *Cel pracy*. Cele szczegółowe podjętych badań – zadania badawcze zostały sformułowane w postaci siedmiu klarownych pytań. Przynajmniej część z nich dotyczy mechanizmu reakcji na stres mechaniczny stąd można by się zastanawiać czy nie warto było umieścić tego aspektu badań w tytule rozprawy (np. w postaci podtytułu).

Wyniki badań stanowią najobszerniejszą część dysertacji. Zostały one zaprezentowane na 40 stronach w jedenastu podrozdziałach i zakończone obszerną, szczegółową dyskusją oraz podsumowaniem. Część podrozdziałów podzielono na dalsze sekcje, pokrywające się tematycznie z zastosowanymi przez Autorkę podejściami eksperymentalnymi. Wyniki zostały czytelnie zaprezentowane w postaci dwudziestu kilku, w większości złożonych wykresów bądź diagramów, czterech paneli fotograficznych i dwóch tabel. W *Dyskusji* Autorka zanalizowała wszystkie uzyskane wyniki, główne obserwacje zebrała w *Podsumowaniu*, zaś próbę ich interpretacji zamieściła w jedenastopunktowych *Wnioskach*.

W pracy zacytowane zostały 232 pozycje bibliograficzne. Ponad 80% tych prac powstało po 2000 roku a pozostałe w znacznej większości zostały opublikowane na przełomie wieków, co doskonale ilustruje aktualność badanych zagadnień. Oprócz oryginalnych prac doświadczalnych i metodycznych Autorka zacytowała ok. 80 aktualnych opracowań przeglądowych. Byłoby z pewnością korzystne dla czytelnika poszukującego szczegółowych informacji źródłowych aby te cytaty zostały wyróżnione w tekście.

Ocena merytoryczna

Praca poświęcona jest wieloaspektowym studiom nad reakcjami indukowanymi przez uszkodzenie mechaniczne liści rozetowych rzodkiewnika pospolitego, *Arabidopsis thaliana*. Część badań miała na celu detekcję spowodowanych zranieniem zmian w wybranych procesach metabolicznych: oddychaniu i fotosyntezie, ściśle związanym z nimi metabolizmie cukrów i aktywności uczestniczących w nim enzymów, a także produkcji metabolitów wtórnych. Z jednej strony Autorka starała się ustalić czy i jaki wpływ ma zranienie liści na badane procesy, z drugiej poszukiwała powiązań pomiędzy zmianami, które mogą świadczyć o zaangażowaniu tych procesów w działania naprawczych. Drugim głównym celem badań było sprawdzenie czy zaburzenie sygnału o zranieniu przekazywanego przez hormony prowadzi do ograniczenia lub zmiany odpowiedzi fizjologicznej roślin na ten stres. Autorka przeprowadziła badania porównawcze roślin dzikiego typu i trzech mutantów wykazujących nieprawidłowości w funkcjonowaniu trzech głównych hormonów stresowych: etylenu, kwasu jasmonowego i kwasu abscysynowego. Mutanty te, *ein4*, niewrażliwy na etylen, *aos*, wykazujący deficyt kwasu jasmonowego oraz *rcd1-1*, o zmniejszonej wrażliwości na etylen, kwas abscysynowy i jasmonian metylu, zostały użyte w badaniach stresu mechanicznego po raz pierwszy.

Szereg interesujących wyników otrzymała Autorka w badaniach rzodkiewnika typu dzikiego:

- Na podstawie pomiarów kalorymetrycznych stwierdziła, że krótkotrwały stres mechaniczny nie powoduje znacznej intensyfikacji przemian metabolicznych ani nie wpływa w sposób istotny na gospodarkę energetyczną rzodkiewnika. Natomiast analiza widm ramanowskich wykazała istotną reorganizację w składzie chemicznym, którą Autorka zinterpretowała jako skutek uruchomienia alternatywnych szlaków metabolicznych

- Jak wykazały badania wymiany gazowej i fluorescencji chlorofilu *in vivo* zranienie nie powoduje długotrwałej zmiany aktywności fotosyntetycznej ani uszkodzeń PSII natomiast wyraźnie zwiększa intensywność oddychania w rozetach rzodkiewnika dzikiego typu.

- W reakcji na zranienie uruchamiane są przede wszystkim lokalne reakcje odpornościowe. Po krótkim czasie następuje synteza H_2O_2 , szybka akumulacja kalozy i wzrost aktywności inwertazy apoplastycznej, cwINV, która dostarcza cukrów do odbudowy uszkodzonych ścian komórkowych.

- Akumulacja H_2O_2 w pobliżu miejsca zranienia i w wiązkach przewodzących wskazuje na funkcję ochronną i sygnalizacyjną nadtlenu wodoru.

- Znaczny spadek zawartości sacharozy stwierdzony metodą HPLC w liściach po ich zranieniu skorelowała Autorka ze wzrostem aktywności inwertaz¹⁾.

Kolejnych ciekawych faktów dostarczyły analogiczne eksperymenty przeprowadzone z użyciem mutantów:

- Zaburzenia szlaków hormonalnych sygnalizujących zranienie skutkują silniejszą reakcją rośliny na działanie stresu mechanicznego, niż samo uszkodzenie liści.

- Obniżona wrażliwość na hormon lub jego niedobór powodują zmniejszenie intensywności wymiany gazowej, zarówno fotosyntezy jak i oddychania, w roślinach mutantów *ein4*, *aos* i *rcd1-1*. Rośliny te nie wykazują także wzrostu aktywności oddechowej wyraźnego w dzikim typie po upływie doby od zranienia.

- Redukcja aktywności UGPazy, enzymu zajmującego centralne miejsce w przemianach cukrów, zaobserwowana po zranieniu w liściach mutantów *aos* i *ein4* pozwala przypuszczać, że kwas jasmonowy i etylen uczestniczą w regulacji aktywności tego enzymu po zadziałaniu czynników stresowych.

- Zahamowanie lokalnych odpowiedzi na uszkodzenie mechaniczne w mutancie *aos* wykazującym deficyt kwasu jasmonowego wskazuje według Autorki na nadrzędną rolę tego hormonu w sygnalizacji o zranieniu. Natomiast brak zmian w reakcji roślin *ein4* niewrażliwych na etylen na uszkodzenie rozet liściowych może wskazywać na drugorzędną rolę etylenu²⁾.

Godną podkreślenia cechą badań jest ich wielostronność. Doktorantka posłużyła się imponującą gamą różnorodnych technik, od spektroskopii ramanowskiej, kalorymetrii i fluorymetrii chlorofilu *in vivo* przez tlenometryczne pomiary wymiany gazowej, analizy histochemiczne, do klasycznych technik biochemicznych: oznaczania zawartości węglowodanów i aktywności enzymów uczestniczących w ich przemianach, ekstrakcji i absorpcyjometrycznego oznaczania zawartości metabolitów wtórnych i produktów peroksydacji lipidów. Do analizy zmian w składzie węglowodanów użyła także HPLC. Opis tych technik zamieszczony w części metodycznej jest dokładny i szczegółowy co pozwala na powtórzenie eksperymentów w innym laboratorium (z zastrzeżeniem w punkcie¹⁾ poniżej).

Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne

¹⁾ Spadek zawartości sacharozy stwierdzony metodą HPLC i interpretacja tego wyniku budzą pewne wątpliwości. Z jednej strony zupełnie różny wynik otrzymano metodą enzymatyczną, co Autorka przypisuje różnicy w materiale poddanym analizom. Do badań zawartości cukrów metodą enzymatyczną wykorzystywała całe rozety, a więc zarówno liście zranione jak niezranione, do badań HPLC – liście zranione (?). Tej różnicy metodycznej można się tylko domyślać ponieważ nie została ona jednoznacznie stwierdzona w części dyskusji poświęconej rozbieżnościom w oznaczeniach cukrów. Informacja o tym, które liście zostały użyte do oznaczenia zawartości cukrów rozpuszczalnych powinna się przede wszystkim znaleźć w podrozdziale 3.9.4. Wydaje się także, że wobec nacięcia połowy liści w rozecie tak duży spadek sacharozy powinien znajdować jednak odbicie w wynikach otrzymanych metodą enzymatyczną. Co więcej, metodą HPLC nie stwierdzono znaczącego wzrostu zawartości glukozy i tylko niewielki, przejściowy wzrost zawartości fruktozy.

Analiza porównawcza wyników dotyczących zmian zawartości cukrów i aktywności enzymów odpowiedzialnych za ich przemiany ujawniła jeszcze jeden brak w części metodycznej: czas po którym pobierano próbki liści do oznaczeń, 2h i 24h podany jest jedynie w odniesieniu do momentu zranienia liści. Nie znalazłam natomiast usytuowania

momentu zranienia w odniesieniu do fotoperiodu, innymi słowy informacji, o której godzinie nacinano liście w roślinach dla których wyniki są porównywane. Czy zawsze zranienia dokonywano o tej samej porze dnia? Ze względu na ewentualne różnice w odstępach od zakończenia procesu fotosyntezy jest to informacja kluczowa, z pewnością warunkująca zasadność dokonywania porównań zawartości cukrów, aktywności enzymów przetwarzających cukry lub poziomów oddychania.

²⁾ Niewrażliwość mutantu *ein4* na etylen wynika z braku receptora EIN4, jednego z pięciu receptorów etylenu ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 i EIN4, które mogą się wzajemnie zastępować. Czy tej możliwości *redundancy* nie należy wziąć pod uwagę przy analizie różnic pomiędzy badanymi mutantami w reakcji na zranienie?

Charakterystyka mutantów zamieszczona na str. 39 jest zbyt lakoniczna i wymaga udokładnienia. Zdając sobie sprawę, że wobec komplikacji badanych układów rozważenie wszystkich scenariuszy nie jest możliwe, uważam jednak, że dokładniejsza informacja na temat istoty mutacji w badanych roślinach może być przydatna do projektowania dalszych doświadczeń. Z tego samego powodu prosiłabym Autorkę o krytyczną ocenę wyboru mutantów wykorzystanych w dotychczasowych eksperymentach i ewentualne propozycje doboru takich roślin do przyszłych badań, których przeprowadzenie sugerowała w dyskusji.

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca ma przejrzysty układ i jest starannie zredagowana, co ułatwia śledzenie skomplikowanej treści. Na podkreślenie zasługuje dobra strona graficzna, właściwy dobór, jakość i ogólnie prawidłowy opis ilustracji i tabel. Innym godnym pochwały faktem jest znikoma liczba w tekście tzw. literówek i niewielka liczba innych drobnych błędów, a także unikanie wyrażen żargonowych, które często stanowią zmorę polskojęzycznych tekstów naukowych.

Problemem, nad którym Autorka powinna popracować jest dość niefrasobliwe użycie czasów i trybów. Często bowiem w opisie i interpretacji wyników, cudzych i własnych, czas przeszły zmieniany jest na teraźniejszy i z powrotem w kolejnych zdaniach, bez wyraźnej ku temu przyczyny, a przede wszystkim bez jasnego schematu logicznego. Zmiana trybu z niedokonanego na dokonany i odwrotnie występuje natomiast powszechnie w opisie metod. Obie te niedoskonałości gramatyczne nie wpływają w sposób istotny na zrozumienie tekstu, jednak niepotrzebnie rozpraszają czytelnika i utrudniają skupienie się na istocie przekazu.

Pozostałe uwagi merytoryczne i edytorskie

Materiały i metody

Na ryc. 9 przedstawiono schemat pomiaru fluorescencji bogatszy od podanego w tekście. Błyski FR i dodatkowe oznaczenia parametrów wymagają wyjaśnienia przynajmniej w opisie rysunku.

Podrozdział 3.7.: Czy oznaczano intensywność wymiany gazowej pojedynczych liści? Których? W pomiarach fotosyntezy użyto wysokiego natężenia napromieniowania, $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Czy użyte mutanty nie są wrażliwe na silne światło? To mogłoby tłumaczyć niski poziom fotosyntezy mutantów w stosunku do roślin dzikiego typu.

3.9.1.: Skąd pochodzi metoda ekstrakcji cukrów z materiału roślinnego?

3.12.2.: Nieprecyzyjny opis obliczania zawartości tanin.

Wszystkie wyniki ilościowe zostały poddane analizie statystycznej. Jednak jednozdaniowa uwaga na ten temat zamieszczona w podrozdziale 3.14. jest zbyt lakoniczna i powinna być

uzupełniona o poglądowe wyjaśnienie zastosowanego kodu literowego, zwłaszcza o znaczenie w tym kodzie koloru czerwonego.

Wyniki

Tab. 3.: Opis zawiera niepotrzebne odnośniki Z2 i Z24. Różnice w średnicach rozet wydają się nieistotne wobec dużego rozrzutu wartości. Mutant *ein4* ma dużą średnicę rozety ale także najdłuższe ogonki liściowe. Może zamiast średnicy rozety należało zmierzyć powierzchnię jej rzutu?

Tab. 4.: Chyba czytelniejszy byłby diagram.

Ryc. 16.: Więcej informacji dostarczyłoby porównanie obrazów naciętych i nienaciętych liści.

Dyskusja

Kilka fragmentów jest trudnych w odbiorze ponieważ każde kolejne zdanie dotyczy różnego typu doświadczeń np. fragment dotyczący parametrów fluorescencji chlorofilu *in vivo* na str. 102.

Str. 102. następny akapit: Trudno zgodzić się ze stwierdzeniem „W badaniach własnych nie zaobserwowano istotnego wpływu zranienia na intensywność fotosyntezy netto u roślin”. ponieważ dziki typ wykazał silne obniżenie poziomu fotosyntezy 2 godziny po zranieniu.

Niejasne/niezgrabne sformułowania: „Deficyt JA u mutantu *aos* mógł być przyczyną ograniczenia lokalnej reakcji odpornościowej na zranienie, objawiającej się (?) nie tylko brakiem kumulacji H₂O₂ ale również brakiem wzmożonej aktywności (?) UGPazy dostarczającej substratów do odbudowy ściany komórkowej.” (str.113); „Dalsze badania rozwijające zagadnienie wpływu zranienia na powstanie stresu oksydacyjnego i antyoksydacyjnej roli cukrów w reakcji obronnej roślin na powstałe stresy wydaje się być ciekawym aspektem mogącym być kontynuacją niniejszej pracy.” (str.115).

Podsumowanie

Pomimo wyżej sformułowanych krytycznych uwag przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Edyty Łukaszuk jest pracą wartościową w sensie poznawczym i dostarcza szeregu nowych, ważnych informacji o konsekwencjach metabolicznych stresu mechanicznego i mechanizmach używanych przez rośliny w obronie przed tym stresem. Autorka osiągnęła zakładane cele, wykazała się umiejętnością wielostronnego podejścia do badanych zjawisk oraz zastosowania rozmaitego typu metod eksperymentalnych, co doskonale rokuje w jej przyszłej karierze. Rozprawa jest świadectwem dojrzałości naukowej autorki, jej rzetelności i konsekwencji w prowadzeniu pracy badawczej. Świadczy także, że doktorantka umiejętnie planuje i prowadzi skomplikowane technicznie doświadczenia, analizuje wyniki i poddaje je krytycznej dyskusji.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego na Uniwersytecie w Białymstoku o dopuszczenie mgr Edyty Łukaszuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabrys