

Wrocław, 12.05.2021r.

Dr hab. Małgorzata Janicka, prof. UWr
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin,
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Wrocławskiego

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Iwony Sadury zatytułowanej:

„Rola brasinosteroidów w procesach aklimatyzacyjnych roślin jęczmienia do niskiej i
wysokiej temperatury”

Stresy abiotyczne ograniczają plonowanie oraz wzrost wielu gospodarczo ważnych gatunków roślin. Szczególnie niekorzystne działanie dla roślin mają stresy temperaturowe. W naturalnych warunkach rośliny stale narażone są na nieprzewidywalne zmiany temperatur, które mogą powodować uszkodzenie błon, prowadzące do wzrostu ich przepuszczalności, często również dochodzi do dehydratacji. Rośliny w takich okolicznościach modyfikują swój metabolizm, aby przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe. Uruchamiają ścieżki transdukcji sygnału prowadzące do zmian pozwalających im na przetrwanie niekorzystnych warunków. Bardzo często w tych ścieżkach sygnałowych uczestniczą fitohormony. Niezmiernie ważne jest kompleksowe poznanie mechanizmów adaptacji roślin do zbyt niskiej lub zbyt wysokiej temperatury, co jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska na temat roli brasinosteroidów w procesach aklimatyzacyjnych roślin do niskiej i wysokiej temperatury wpisuje się w tą aktualną i ważną tematykę badawczą. Została ona wykonana w Zakładzie Biologii Rozwoju, w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Janeczko prof. Instytutu Fizjologii Roślin PAN. Praca jest ściśle związana z głównym nurtem badań Zespołu dotyczącym mechanizmów aklimacyjnych roślin uprawnych, ze szczególnym uwzględnieniem roli brasinosteroidów w tym procesie.

Praca doktorska mgr Iwony Sadury to cykl publikacji, który został opracowany i przedłożony mi do recenzji jako rozprawa doktorska. Praca składa się z wykazu artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji oraz 7 kolejnych rozdziałów i materiałów uzupełniających (spis literatury, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz załączniki). Ma układ typowy dla rozpraw doktorskich z dyscypliny nauk biologicznych, przygotowanych w formie cyklu publikacji naukowych. Opracowanie do cyklu składa się z 46 stron, 11 rycin (jednej nie przypisano numeru) oraz z 2 tabel (jednej nie przypisano numeru). W pracy doktorskiej umieszczono 6 publikacji składających się na cykl, w 5-ciu z nich Pani Sadura jest pierwszym autorem. Wszystkie publikacje znajdują się w aktualnym wykazie czasopism MNiSW. Zamieszczono również informacje o źródłach finansowania badań doktorantki, dwa granty (NCN OPUS i NCN Preludium), w których mgr Iwona Sadura jest odpowiednio

wykonawcą i kierownikiem. Opracowanie przygotowano w języku polskim, załączając anglojęzyczne streszczenie.

Ocena merytoryczna rozprawy jest mi w dużej mierze ułatwiona, z uwagi na fakt, że prezentowane w dysertacji wyniki zamieszczone są w cyklu prac opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach (*Biologia Plantarum*, *Journal of Plant Growth Regulation*, *Journal of Molecular Science*, *Journal of Plant Physiology*, *Cells* oraz *Biomolecules*) o wysokich współczynnikach oddziaływań, gdzie zostały poddane skrupulatnej ocenie niezależnych recenzentów. Rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką promotora, powinna stanowić samodzielne rozwiązanie problemu naukowego i być dowodem umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Pani mgr Iwona Sadura będąc kierownikiem projektu, a także pierwszym autorem większości prac w cyklu składających się na rozprawę doktorską oraz przygotowując opracowanie do cyklu publikacji, w mojej ocenie jednoznacznie wykazała swoje zdolności do napisania kompletnej rozprawy doktorskiej, jako jednej z ważnych cech kwalifikacji do zawodu naukowca.

Wstęp opracowania, tutaj nazwany Wprowadzeniem, podzielony jest na dwa podrozdziały, przedstawiające w sposób uporządkowany aktualną wiedzę dotyczącą podjętego tematu. W pierwszej kolejności opisane są brasinosteroidy, ich budowa, synteza, mechanizm działania oraz rola w procesach rozwojowych i adaptacji do stresów (ta część mogła być nieco szerzej opisana, choć mam na uwadze, że to tylko opracowanie do cyklu publikacji i znaczna część informacji znajduje się we właściwych artykułach - jak choćby w pracy przeglądowej z 2018 roku). Dalej opisane są stresy temperaturowe i zjawiska aklimacji. Ta część wprowadzenia jest znacznie obszerniej zaprezentowana. Doktorantka pracuje na jęczmieniu, więc zwraca tu uwagę czytelnika na hartowanie chłodem roślin ozimych, ale pisze też o aklimacji zbóż jarych, o zmianach metabolicznych w czasie procesu hartowania chłodem. Później przechodzi do opisanego tolerancji roślin na wysoką temperaturę. W tej części opracowania Pani Sadura pisze jak ważne jest usztywnienie błon komórkowych w roślinach narażonych na działanie niskiej temperatury oraz wzrost płynności w wyniku działania wysokich temperatur. Natychmiast nasuwa się pytanie, czy BR mogą przyczyniać się od tych procesów albo jaką rolę mogą odgrywać przeciwdziałając negatywnym skutkom stresów temperaturowych? Na to pytanie można znaleźć odpowiedź zapoznając się z dalszą częścią opracowania i cyklem publikacji. W konsekwencji tak zaprezentowany istniejący stan wiedzy stanowi płynne wprowadzenie do Celu pracy, którym dla Doktorantki było wykazanie roli BR w podnoszeniu tolerancji jęczmienia na niską i wysoką temperaturę. Pani Sadura postawiła sobie 3 pytania. Pierwsze to czy u mutantów z deficytem BR aklimacja będzie mniej skuteczna i zmniejszy się tolerancja na ekstremalne temperatury. Drugie czy deficyt BR i zaburzona ich percepcja może zmieniać gospodarkę hormonalną i wydajność fotosyntezy. Trzecie postawione pytanie to czy BR wpływają na strukturę i funkcjonowanie błon komórkowych w roślinach poddanych działaniu niskiej i wysokiej temperatury. Tutaj mała uwaga: w Celu pracy Doktorantka określa dokładnie zakres temperatur wysokich (38 i 45°C), a przy niskich temperaturach brak takiego zakresu - pisze tylko „mroz”. Wskazuje wprowadzić te mrozowe temperatury, ale dopiero w kolejnym rozdziale. W dalszej części Doktorantka opisuje materiał badawczy – rośliny jęczmienia, typ dziki (odmiana Bowman) oraz linie z zaburzoną biosyntezą BR (BW084) oraz zaburzoną percepcją BR (BW312), a także odmianę Delisa i jej mutant 522DK (mutant z zaburzoną syntezą BR). Doktorantka zapoznaje też czytelnika z ogólnym

modelem eksperymentu, który był tożsamy dla wszystkich prezentowanych prac badawczych. Schemat eksperymentów został zamieszczony na rycinie (brak jej numeracji). W kolejnym rozdziale – stanowiącym w zasadzie tylko tabelę (brak jej numeracji) mgr Iwona Sadura przedstawia spis stosowanych przez nią metod w pracach.

Tutaj mam pewne obiekcje dotyczące wykorzystania metody wirowania różnicowego do izolacji błon komórkowych z roślin. Wirowanie różnicowe przez 30 minut przy 80 000 x g pozwala na osadzenie się frakcji różnych mikrosomów: m.in. plazmolema, tonoplast, retikulum endoplazmatyczne (pierwsze wirowanie różnicowe 10 min., 10 000 x g wyeliminowało plastydy i mitochondria). O ile zastosowanie takiej metody jest skuteczne i prawidłowe w przypadku publikacji z International Journal of Molecular Science (2020a), do pokazania obecności białek HSP w błonach izolowanych z komórek jęczmienia, o tyle stosowanie tej samej metody do oznaczenia białek znajdujących się w plazmolemie nie jest do końca trafne (wyniki opublikowane w Journal of Plant Physiology 2020b). W tym przypadku wirowanie różnicowe to tylko początkowy etap izolacji plazmolemy. Aby uzyskać czysty preparat plazmolemy jedyną wysoce skuteczną metodą jest izolacja w układzie dwufazowym, dwóch polimerów Dekstran T-500 i glikol polietylenowy (PEG). Otrzymany osad w wyniku wirowania różnicowego (30 min 80 000 x g) nanosi się na układ dwufazowy, aby z mieszaniny błon wyizolować konkretnie interesującą nas w badaniach plazmolemę. Gdybyśmy chcieli wyizolować z tej mieszaniny błon np. tonoplast, osad taki należałoby nanieść na odpowiedni gradient sacharozy... itp. Dzięki takim metodom możemy uzyskać bardzo czyste frakcje błonowe. Wykorzystując tylko wirowanie różnicowe uzyskujemy mieszaninę błon, gdzie plazmolema stanowi tylko pewien udział. Absolutnie jednak nie podważam wyników pracy opublikowanej w Journal of Plant Physiology. Doktorantka uzyskała bowiem w swoich preparatach frakcje błonowe, gdzie w składzie była m.in. plazmolema, o czym świadczą chociażby prezentowane na rycinie 1B i 2B wyniki z Western Blot dotyczące akumulacji we frakcji błonowej białka plazmolemowej pompy protonowej, a wiadomo przecież, że H^+ -ATPaza jest enzymem markerowym dla plazmolemy.

W dalszej części opracowania Doktorantka dokonała przeglądu najważniejszych wyników z cyklu publikacji (B-F), które zostały ułożone w logiczny sposób, po kolei odpowiadając na zadane sobie wcześniej 3 pytania. Pani Sadura analizując przeżywalność roślin, wykazała, że mutanty odmiany Bowman zarówno z zaburzoną syntezą jak i percepcją BR charakteryzują się mniejszą przeżywalnością. Aklimacja do niskich temperatur wiąże się ze zwiększoną ilością BR w liściach. Z drugiej strony przeciwny wynik uzyskano w przypadku aklimacji do wysokiej temperatury, na skutek aklimacji można było nawet zaobserwować spadek zawartości BR. Zaintrygowało mnie, dlaczego wszystkie mutanty, zarówno odmiany Bowman jak i Delisa, po aklimacji mają lepszą tolerancję na stres wysokiej temperatury niż rośliny typu dzikiego? W pracy (Journal of Plant Growth Regulation z 2019 r.) Doktorantka pisze, że również nie spodziewała się takiego wyniku i próbuje go interpretować, porównując własne wyniki np. z pracą Mazzora i wsp. (2011), gdzie również zaobserwowano takie zjawisko. Czy dzisiaj, z bogatszym doświadczeniem nad badaniem roli BR w procesach aklimacji, interpretacja tego zaskakującego wyniku uległaby zmianie? Czy nadal obserwowane zjawisko Pani Sadura przypisałaby różnicy we wzroście i powierzchni liści między mutantami i dzikim typem? Czy może jednak miałyby tu wpływ skład lipidowy, płynność błony, albo jeszcze jakieś inne zjawisko?

Dalej w opracowaniu przedstawione są wyniki dotyczące poziomu BR, wskazujące, że w częściach nadziemnych jęczmienia dominującą formą są homokastasteron i kastasteron. Doktorantka analizując poziomy BR u mutantów i w typie dzikim wnioskuje, że w chloroplastach występują nieznane jeszcze mechanizmy akumulacji BR pozwalające na utrzymanie ich niezbędnego poziomu niezależnie od zaburzeń w biosyntezie, co jest w mojej ocenie bardzo ciekawe.

Pani Iwona Sadura, odpowiadając na drugie zadane sobie pytanie w swojej dysertacji, przeanalizowała gospodarkę hormonalną jęczmienia narażonego na działanie niskiej i wysokiej temperatury w mutantach BR i w typie dzikim (publikacja B). Po wnikliwej analizie zauważyła, że zaburzenia zarówno w biosyntezie brasinosteroidów jak i ich percepcji przyczyniają się do zmian w poziomie innych fitohormonów (auksyn, cytokinin, giberelin oraz kwasu abscysynowego i salicylowego), co może skutkować zakłóceniem transdukcji sygnału. Skłania się też do wniosków, że to właśnie zaburzenie gospodarki hormonalnej może być przyczyną obniżonej tolerancji na mróz.

Kolejne wyniki prezentowane przez Doktorantkę to odpowiedź na trzecie zadane sobie pytanie, czy BR wpływają na strukturę i funkcjonowanie błon komórkowych w roślinach poddanych działaniu niskiej i wysokiej temperatury. W publikacjach (Cells, 2019r. i Biomolecules 2019r.) pokazano, że niższa płynność membran u mutantów poddanych działaniu niskiej temperatury przyczyniała się do obniżonej tolerancji na niską temperaturę, przy czym ten sam obniżony stopień płynności powodował zwiększoną tolerancję na stres wysokiej temperatury. Magister Iwona Sadura określiła też, jak zaburzona synteza BR i ich percepcja wpływa na ekspresję genów kodujących HSP i ich akumulację w błonach komórkowych. Ponadto wskazała rolę BR w modyfikacji ekspresji genów kodujących dwa plazmolemowe białka, tj. akwaporynę i pompę protonową oraz ich akumulację w błonie. Są to białka, których rola w procesach adaptacji do stresów abiotycznych jest kluczowa.

Ostatecznie wyniki zostały bardzo dobrze podsumowane w kolejnym rozdziale (Podsumowanie) i zakończone wnioskami konkludującymi, że BR należy zakwalifikować jako regulatory istotne z punktu widzenia kształtowania tolerancji na stres temperaturowy. Zwykle wnioski są prezentowane w postaci punktów i takiego zapisu trochę mi tutaj zabrakło. Jednak rozumiem zamiar Doktorantki, aby sformułować jeden wspólny, ogólny wniosek do wszystkich zebranych prac badawczych.

W opracowaniu do cyklu publikacji Pani Sadura używa określenia „membrana” do nazwania błon biologicznych. W mojej ocenie to określenie w języku polskim nieco razi, a jest pewnie wzięte z bezpośredniego tłumaczenia angielskiego słowa „membrane”.

Dużym atutem przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej jest wykorzystanie mutantów z zaburzoną syntezą BR lub transdukcją brasinosteroidowego sygnału. Często spotyka się w publikacjach stosowanie inhibitorów syntezy BR (np. propikonazolu), aby niwelować poziom brasinosteroidów. Jednak w takich eksperymentach można zaburzyć naturalną homeostazę steroidową w komórce roślinnej. Dlatego, tak jak zrobiła to Doktorantka, zdecydowanie korzystniej badania wykonać na mutantach roślin, z zaburzoną syntezą BR, bez chemicznej ingerencji, która może znacznie zakłócić metabolizm roślin.

W mojej ocenie, rozprawa doktorska mgr Iwony Sadura, jest tak obszerna i jakościowo cenna, że postawione przez Nią trzy pytania i udzielone na nie odpowiedzi mogły być z powodzeniem trzema niezależnymi dysertacjami.

Reasumując, uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa mgr Iwony Sadury ma charakter oryginalnej pracy naukowej i spełnia wszelkie wymagania stawiane dysertacji doktorskiej. Autorka wykazała duże kompetencje merytoryczne i dobrą znajomość literatury dotyczącej opracowywanego tematu. Dobór odpowiednich obiektów badawczych oraz sekwencja przeprowadzonych analiz zaprezentowanych w publikacjach, dowodzą, że badania zaplanowano i wykonano z pełną świadomością osiągnięcia założonych celów. Wobec powyższego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Iwony Sadury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na bardzo obszerne spektrum wykonanych badań, mogących stanowić więcej niż jedną rozprawę doktorską oraz uzyskanie niezwykle cennych wyników, zamieszczonych w cyklu aż 6-ciu, bardzo dobrych jakościowo publikacjach, wnoszę o wyróżnienie rozprawy.

Dr hab. Małgorzata Janicka, prof. UWr

