



Prof. dr hab. Iwona Szarejko  
Katedra Genetyki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski, Katowice

Katowice 9 września 2019

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej mgr Piotra Zgłobickiego**  
**pt. „Modulacja odpowiedzi roślin na UV pod wpływem światła widzialnego i cukrów”**  
wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Haliny Gabryś  
w Zakładzie Biotechnologii Roślin Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego.

**Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie**

Rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Zgłobickiego przedstawia kompleksową analizę odpowiedzi roślin *Arabidopsis thaliana* na promieniowanie UV, przeprowadzoną na poziomie molekularnym, komórkowym, fizjologicznym i morfologicznym oraz próbę wyjaśnienia mechanizmów wpływających na zmiany tej odpowiedzi pod wpływem światła widzialnego i cukrów. Promieniowanie UV-B o długości fali 280–315 nm jest częścią widma światła słonecznego docierającego do powierzchni ziemi o największej energii. Jest ono absorbowane przez rośliny, a pochłonięta energia może prowadzić do uszkodzeń DNA, białek czy lipidów. Z drugiej strony, promieniowanie UV-B indukuje klasyczną odpowiedź fotomorfogenetyczną, rośliny, przejawiającą się między innymi, w skróceniu hypokotyli i zwiększeniu powierzchni liści. W toku ewolucji rośliny wytworzyły szlak przekazywania sygnału UV-B, w którym za pośrednictwem specyficznego receptora UVR8, sygnał ten reguluje procesy wzrostu, rozwoju i adaptacji roślin do stresu. Ostatnie lata przyniosły intensywny rozwój badań nad mechanizmami percepcji i przekazywania sygnału UV-B w roślinach, także w odpowiedzi na zmiany środowiskowe związane ze zmniejszaniem się warstwy ozonowej stanowiącej naturalną ochronę przed promieniowaniem UV. Tak więc problematyka pracy Doktoranta nawiązuje do bardzo aktualnych wyzwań badawczych, a zespół naukowy Zakładu Biotechnologii Roślin WBBiB UJ, kierowany przez Prof. dr hab. Halinę Gabryś, należy do czołowych ośrodków, zajmujących badaniami mechanizmów działania fotoreceptorów roślinnych, w szczególności receptorów światła niebieskiego i UV, ich znaczeniem fizjologicznym i regulacją ekspresji genów przez światło. Przedstawiona rozprawa doktorska



mgr Piotra Zgłobickiego stanowi nowy rozdział tych bardzo aktualnych i ważnych merytorycznie badań.

#### **Szczegółowe cele rozprawy, obiekt badań i zastosowane metodyki badawcze**

Głównym celem badań podjętych przez Doktoranta było zbadanie wpływu światła widzialnego i cukrów na molekularne i fizjologiczne mechanizmy chroniące rośliny przed promieniowaniem ultrafioletowym. Przeprowadzone przez Doktoranta badania dotyczyły różnych poziomów ochrony, obejmujących: absorpcję promieniowania, ochronę przed stresem oksydacyjnym oraz naprawę uszkodzeń powstałych w DNA jądrowym i chloroplastowym. Doktorant badał także, czy ruchy jądra komórkowego i chloroplastów mogą służyć ochronie przed uszkodzeniem DNA zawartego w tych organellach i podjął próbę charakterystyki indukcji kwitnienia zależnej od sacharozy i UV.

Obiektem badań była modelowa roślina dwuliścienna *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0), dla której istnieje szerokie spektrum materiałów genetycznych dostępnych dla badaczy. Należą do nich wykorzystane w tej pracy mutanty insercyjne genów dla fototropiny 1 i 2: *phot1* i *phot2*, charakteryzujące się zmianami ruchów chloroplastów oraz mutant fotoreceptora UV-B, *uvr8* (*uvr8-6*). Doktorant wykorzystał także podwójnego mutant *phot1phot2*, którego wyprowadził samodzielnie w ramach tej pracy.

Dla osiągnięcia postawionego celu, mgr Piotr Zgłobicki przeprowadził szereg doświadczeń, w których analizował kolejno:

- (1) wpływ sterowanych światłem niebieskim ruchów jąder komórkowych i chloroplastów na unikanie ekspozycji na UV
- (2) wpływ różnych stężeń glukozy i sacharozy dodanych do pożywki na:
  - produkcję barwników pochłaniających UV
  - produkcję roślinnych przeciwutleniaczy
  - poziom uszkodzeń DNA (dimerów cyklobutyłowych i 6-4 pirymidynowych) po naświetleniu UV
  - wydajność naprawy uszkodzeń DNA w roślinach przeniesionych do różnych warunków świetlnych
  - ekspresję genów zaangażowanych w różne szlaki naprawy DNA
  - wydajność fotosyntetyczną roślin po naświetleniu UV.
- (3) wpływ długoterminowego wzrostu roślin na pożywcze z cukrami na przeżywalność, wzrost i rozwój roślin traktowanych różnymi dawkami UV ( $2,5 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ,  $28 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ )
- (4) mechanizm zależnej od sacharozy i UV indukcji kwitnienia

Do realizacji wymienionych celów mgr Piotr Zgłobicki zastosował nowoczesne techniki i metody z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki i fizjologii roślin. Wykazał się biegłą znajomością technik analizy DNA, w tym metod izolacji jąder komórkowych i chloroplastów, analizy ekspresji genów z wykorzystaniem RT-qPCR, pomiarów ilości poszczególnych typów dimerów pirymidynowych z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego Elisa, a także metod analizy zawartości barwników fotosyntetycznych, przeciwutleniaczy i związków polifenolowych za pomocą HPLC.





Zastosowane w pracy obiekty i metody badawcze oceniam jako w pełni odpowiednie dla osiągnięcia założonego przez Doktoranta celu badawczego. Doświadczenia zostały zaplanowane w sposób starannie przemyślany, a metody właściwie dobrane do każdego eksperymentu. Zastanowiło mnie jedynie, dlaczego Doktorant badał ekspresję wielu genów związanych z procesami naprawy DNA u roślin rosnących na pożywkach z cukrami, lecz nie analizował ekspresji tych genów u roślin rosnących na tych samych podłożach po działaniu promieniowaniu UV. Chciałabym w tym miejscu zapytać, dlaczego Doktorant wybrał taki schemat doświadczalny i jak uzasadnia analizę ekspresji genów naprawy DNA bez indukcji uszkodzeń w DNA? Należy przy tym podkreślić, że w innych doświadczeniach nad wpływem cukrów na odpowiedź roślin na promieniowanie UV, np. w analizie wzrostu i przeżywalności roślin, inicjacji kwitnienia, czy wydajności fotosyntetycznej, Doktorant porównywał kombinacje traktowane UV i nietraktowane.

### **Najważniejsze uzyskane wyniki**

Za najważniejsze rezultaty badań nad wpływem cukrów na ochronę roślin przed działaniem UV i odpowiedź roślin na promieniowanie uważam:

1. Wykazanie, że rośliny hodowane na sacharozie lub glukozie wykazują wzrost przeżywalności po traktowaniu UV-B, skorelowany ze spadkiem poziomu uszkodzeń DNA.
2. Stwierdzenie, że ochronna rola cukrów związana jest ze zwiększoną ilością polifenolowych związków absorbujących UV w roślinie (przede wszystkim kemferytyny i jableczanu sinapoilu), co prawdopodobnie zmniejsza penetrację promieniowania w głąb tkanki
3. Wykazanie, że cukry w podłożu nie wpływają na wydajność procesu naprawy DNA na świetle (fotoreaktywacja), lecz ich wysokie stężenie podnosi poziom naprawy prowadzonej w ciemności
4. Stwierdzenie, że wysoki poziom glukozy i sacharozy w pożywce wzrostu roślin powoduje zmiany ekspresji niektórych genów związanych z naprawą przez wycięcie nukleotydów, naprawą błędnie sparowanych nukleotydów, a także markerów jądrowych proliferujących komórek (PCNA) i gyrazy DNA.
5. Wykazanie, że ochronny mechanizm cukrów w odpowiedzi na naświetlanie UV nie jest związany z poziomem chloroplastowych przeciwutleniaczy, a odwrotnie, obecność cukrów w podłożu powoduje obniżenie poziomu związków poliprenowych, takich jak tokoferole czy plastochoromanol-8.
6. Ustalenie, że substancje osmotycznie czynne w podłożu (cukry, mannitol) powodują zmniejszenie spadku wydajności fotosyntetycznej roślin, wywołanego napromieniowaniem wysoką dawką UV-B

Innym interesującym wynikiem tej pracy, uzyskanym w serii doświadczeń z wykorzystaniem mutantów z zaburzonymi ruchami organelli, jest wskazanie, że sterowane światłem niebieskim ruchy jądra komórkowego i chloroplastów nie stanowią zabezpieczenia przed wywołanymi UV uszkodzeniami DNA w tych organellach. Ciekawe i dające asumpt do dalszych badań jest także ustalenie przez Doktoranta, że przyspieszone kwitnienie, obserwowane po traktowaniu UV u





roślin rosnących na pożywce z sacharozą, nie jest zależne od percepcji sygnału przez receptor UVR8, będący jedynym dotąd opisanym receptorem promieniowania UV-B.

### Ocena formalna pracy

Praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. We Wstępie wyczerpująco przedstawiono aktualne zagadnienia związane z wpływem promieniowania ultrafioletowego na organizmy żywe oraz z mechanizmami ochrony przed promieniowaniem UV. Doktorant omawia skutki działania UV, ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w indukowaniu uszkodzeń w DNA, a następnie przedstawia kolejno procesy związane z ochroną przed promieniowaniem, tj. unikanie promieniowania (w tym ruch jąder komórkowych i chloroplastów), rolę metabolitów wtórnych w ochronie składników komórki przez absorpcję UV i rolę antyoksydantów w ochronie przed działaniem ROS generowanych przez promieniowanie. Szczegółowo przedstawia mechanizmy naprawy DNA wraz z opisem funkcji genów uczestniczących w poszczególnych procesach. W kolejnych częściach Wstępu Doktorant omawia znaczenie cukrów jako cząsteczek sygnałowych i rolę fotoperiodyzmu w indukcji kwitnienia, ze szczególnym uwzględnieniem molekularnych podstaw regulacji tego procesu. Ostatnia część tego rozdziału poświęcona jest funkcji sygnalizacyjnej promieniowania UV-B, z uwzględnieniem niespecyficznych szlaków sygnałowych aktywowanych przez uszkodzenia DNA i specyficznych tylko dla UV-B, związanych z receptorem UVR8. Tak skonstruowany Wstęp dobrze uzasadnia słuszność podjętych przez Doktoranta badań.

Cele pracy i postawione hipotezy badawcze są jasno sformułowane. Podobnie, w przejrzysty sposób skonstruowany jest rozdział Materiały i metody, z klarownym schematem przeprowadzonych doświadczeń. Brakuje mi w tylko szerszego uzasadnienia wyboru konkretnych genów związanych z naprawą DNA, których ekspresję badano w pracy. Doktorant ograniczył się do zamieszczenia ich listy w rozdziale Metody, a funkcji niektórych z tych genów w procesach naprawy DNA opisywał dopiero w Dyskusji. Innych genów, np. jednego z głównych genów naprawy na świetle, *PHR1* kodującego fotoliazę rozkładającą CPD czy głównych genów zaangażowanych w detekcję podwójnych pęknięć DNA i zatrzymanie cyklu komórkowego (*ATM*, *ATR*, *SOG1*) nie analizował w tej pracy. Dlatego chciałabym w tym miejscu zapytać, czym kierował się Doktorant, wybierając te, a nie inne geny z poszczególnych grup genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń w DNA?

Wyniki pracy ujęto w 9 podrozdziałach, przedstawiających opis rezultatów doświadczeń odpowiadających na pytanie lub hipotezę postawione w Celach. Dokumentacja wyników jest kompletna i przejrzysta, obejmuje 19 rycin, na ogół dobrze opisanych, jedynie dwie pierwsze ryciny w Wynikach oznaczone są błędnie jako Rysunek 1 i 2, zamiast 3 i 4, a w podpisie Rysunku 8 brakuje opisu dla wykresu C i D. Kolejny rozdział, Dyskusja została opracowana w sposób wyczerpujący, z pełną znajomością problematyki dotyczącej roli cukrów w procesach wzrostu i rozwoju roślin poddanych działaniu stresów, w tym promieniowania UV. Dyskusję kończy rozdział Podsumowanie, które w dużej mierze stanowi skróconą wersję Streszczenia zamieszczonego na początku rozprawy. Szkoda, że Doktorant nie spróbował w zamian sformułować wniosków ze swoich badań, co nie powinno sprawić mu problemu, biorąc pod



uwagę otrzymane wyniki doświadczeń i świetną znajomość literatury. Należy podkreślić, że bardzo obszerny spis literatury, zredagowany jest starannie, jedynie tytuły niektórych publikacji niepotrzebnie pisane są w sposób zarezerwowany dla książek, tj. zaczynając każdy wyraz dużą literą. Na podkreślenie zasługuje także umieszczenie na początku pracy wykazu skrótów, przygotowanego bardzo starannie, z rozwinięciem skrótów w języku polskim i angielskim, co jest bardzo pomocne dla czytelnika.

Przedstawione w tej recenzji pytania, które traktuję jako temat do dyskusji, i uwagi o charakterze edycyjnym nie wpływają na moją wysoką opinię o merytorycznej wartości rozprawy Pana mgr Piotra Zgłobickiego.

#### **Wniosek końcowy**

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa Pana mgr Piotra Zgłobickiego spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Autor wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej dotyczącej problematyki swych badań, umiejętnością stawiania hipotez naukowych, planowania eksperymentów i stosowania najnowszych metod badawczych z zakresu biologii molekularnej, biologii komórki i fizjologii roślin. Wykazana w rozprawie zdolność mgr Piotra Zgłobickiego do krytycznej oceny uzyskanych wyników i wyważonego wnioskowania świadczy o Jego dojrzałości naukowej. Otrzymane wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Piotra Zgłobickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, sformułowana powyżej ocena upoważnia mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie bardzo wartościowej rozprawy doktorskiej Pana mgr Piotra Zgłobickiego odpowiednią nagrodą.

Prof. dr hab. Iwona Szarejko