Dr hab. Jacek Kęsy
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń

Toruń dn. 03.08.2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Eckstein

pt. „Regulacja przemieszczeń chloroplastów w roślinach wyższych. Interakcje szlaków sygnałowych indukowanych przez światło i auksyny."

Ogólna charakterystyka pracy

Rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr Aleksandrę Eckstein dotyczy badań nad specyficzną reakcją chloroplastów na światło, polegającą na odpowiednim ułożeniu się tych organelli w komórce roślinnej w zależności od natężenia bodźca. Rolą takiej reakcji jest optymalizacja przebiegu procesu fotosyntezy, w tym ochrona chloroplastów przed uszkodzeniami spowodowanymi zbyt silnym światłem. Prace nad ruchami chloroplastów, rozpoczęte na Uniwersytecie Jagiellońskim jeszcze pod koniec lat 40. ubiegłego stulecia przez Profesora Jana Zurzyckiego, kontynuowane są z wieloma sukcesami przez Profesor Halinę Gabryś i jej współpracowników. Zasadniczym elementem układu efektorowego ruchu chloroplastów u większości gatunków roślin jest cytoszkielet aktynowy a percepcja bodźca świetlnego zachodzi z udziałem głównie fototropin - fotoreceptorów światła niebieskiego. Pomimo długiej historii badań nad ruchami chloroplastów, szlaki przekazywania sygnałów od układu receptorowego do efektorowego są ciągle mało poznane. Pokazano, że elementami tych szlaków są kinazy białkowe oraz fosfoinozytole i jony wapnia, ale udział innych przekaźników i ich wzajemne powiązania wymagają zbadania. Bardzo mało wiadomo też, czy nawet nic nie wiadomo, na temat wpływu innych bodźców, np. metabolicznych czy fitohormonów, na przemieszczanie się chloroplastów. Szczególnie intrygujące wydaje się tu zbadanie roli auksyn. Wiadomo bowiem, że fitohormon ten bierze udział w rearanżacji cytoszkieletu aktynowego komórki oraz jest zaangażowany w przebieg innych reakcji rośliny na światło niebieskie: w fototropizmie i otwieraniu aparatów szparkowych. Stąd, zajęcie się tym zagadnieniami przez mgr Aleksandrę Eckstein było w pełni uzasadnione.

Do swoich badań Autorka wybrała trzy gatunki roślin: rzodkiewnika pospolitego, tytoń szlachetny i trzykrotkę białokwiatową, oraz zastosowała trzy podejścia eksperymentalne. W pierwszej grupie doświadczeń badany był wpływ odcinania wierzchołka pędu na indukowane światłem niebieskim ruchy chloroplastów w liściach, zakładając przy tym, że dekapitacja wpłynie na homeostazę auksyny w pędzie i liściach. W celu weryfikacji tej ostatniej hipotezy Autorka dokonała odpowiednich pomiarów stężeń fitohormonów, w tym auksyny, w liściach badanych roślin. W tej grupie doświadczeń znalazły się też eksperymenty z aplikacją auksyny w miejscu odcięcia wierzchołka i aplikacja inhibitorów transportu auksyn na pęd, poniżej wierzchołka wzrostu. Eksperymenty z odcinaniem wierzchołka pędu i aplikacją auksyny wzorowane były na klasycznych doświadczeniach z dominacją wierzchołkową Thimanna i Skooga a pomiar ruchu chloroplastów odbywał się według metody opisanej na początku lat 80. przez Walczaka i Gabryś.

W drugiej grupie doświadczeń badano wpływ auksyny na ruchy chloroplastów i organizację cytoszkieletu aktynowego po bezpośredniej aplikacji hormonu na tkankę. W części doświadczeń dotyczących badania cytoszkieletu zastosowano transgeniczne rośliny rzodkiewnika, w których

cytoszkielet aktynowy wyznakowany był fluoryzującym białkiem fuzyjnym. W trzeciej grupie doświadczeń zastosowano szereg mutantów *A. thaliana* upośledzonych pod względem transportu auksyn i auksynowych szlaków sygnałowych. Zastosowanie przez Autorkę w badaniach trzech gatunków roślin uważam za w pełni uzasadnione.

Struktura oraz treść rozprawy doktorskiej

Opiniowana rozprawa doktorska liczy 114 stron, w tym zamieszczone na początku pracy wykaz stosowanych skrótów i akronimów z wyjaśnieniami w języku polskim i angielskim, streszczenie oraz, na końcu, szczegółowy opis niektórych procedur i wykaz stosowanych odczynników.

Rozprawa ma klasyczny układ. Obejmujący 37 stron tekstu Wstęp został napisany jasno i rzeczowo. Autorka przedstawiła w nim aktualny stan wiedzy dotyczący (1) przebiegu zjawiska ruchu chloroplastów oraz (2) mechanizmów działania oraz roli auksyn w komórkach roślinnych. Zawarte we Wstępie informacje są pomocne do właściwej analizy przedstawionych w rozprawie wyników. Jest to szczególnie ważne dla osób mniej zorientowanych, ponieważ brakuje w literaturze polskojęzycznej opracowań na temat ruchów chloroplastów. Wyodrębniony, jako osobny rozdział Cel pracy i sformułowane w nim zadania badawcze korespondują z tytułem rozprawy i klarownie wyznaczają plan pracy. Wyniki badań, zakończone dosyć obszerną, wyczerpującą dyskusją i podsumowaniem, zostały zaprezentowane w trzech wyraźnie oddzielonych podrozdziałach, pokrywających się tematycznie z trzema podejściami eksperymentalnymi zastosowanymi przez Doktorantkę, o których pisałem wcześniej. Uzyskane wyniki zostały czytelnie zaprezentowane na 12 wykresach, 5 fotografiach i w trzech tabelach. W dyskusji Autorka odniosła się do wszystkich uzyskanych wyników.

W części wprowadzającej pracy, jak i dyskusji, Doktorantka zacytowała 377 dobrze dobranych materiałów źródłowych. W ponad 90% przypadków są to prace oryginalne, opublikowane w większości w ostatnim dziesięcioleciu. Jedna z cytowanych prac nie została jeszcze przyjęta do druku, wobec tego nie powinna znaleźć się w spisie literatury.

Ocena merytoryczna

Na samym początku chciałbym podkreślić, że bardzo wysoko oceniam samą koncepcję pracy, sposób jej realizacji, jak i uzyskane wyniki, jednakże mam również pewne krytyczne uwagi, szczególnie, co do interpretacji wyników. Najpierw o samych wynikach. Autorka wykazała bezspornie, że:

- dekapitacja pędu trzykrotki i tytoniu powodowała częściowe zahamowanie ruchów chloroplastów w liściach położonych poniżej miejsca odcięcia wierzchołka a podanie egzogennej auksyny, naturalnej lub syntetycznej, na powierzchnię cięcia przeciwdziałało skutkom dekapitacji" (Ryc. 7, 9, 10 i 11). Wyniki wykonanych równolegle badań fluorescencji chlorofilu w liściach eliminują stres, jako źródło obserwowanych zmian (Tabela 2),

- dekapitacja, ale i dekapitacja w połączeniu z aplikacją auksyny, jak również aplikacja inhibitorów transportu auksyny, powodują wzrost stężenia auksyny w poddawanych eksperymentom liściach u tytoniu (Tabela 3) – jak wykazała jednak doktorantka, w tym drugim i trzecim przypadku nie obserwowano wyraźnych zmian ruchu chloroplastów,

- bezpośrednia, krótkotrwała ekspozycja liści rzodkiewnika na egzogenną auksynę nie wpływała na ruchy chloroplastów ani na organizację cytoszkieletu aktynowego (Ryc. 12 i 13),

- inhibitory dokomórkowego transportu auksyn 2-NOA oraz wypływu auksyn z komórki NPA i TIBA, podane dokorzeniowo w kulturach *in vitro* rzodkiewnika i tytoniu powodowały osłabienie ruchów chloroplastów (Ryc. 14, 15 i 16), reakcje ruchowe były też znacząco hamowane przez PCIB,

określany mianem antyauksyny – działanie powyższych inhibitorów na reakcje chloroplastów nie były zależne od zmian w strukturze cytoszkieletu aktynowego, ani stężenia auksyny w liściach (Tabela 4),

- mutacje w genach kodujących elementy szlaku przekazu sygnału od auksyny powodowały zaburzenia w ruchach chloroplastów (Ryc. 21),

- inhibitory transportu auksyn i antyauksyna indukowały zmiany w ekspresji fototropin na poziomie mRNA i białka. Nie były one jednak skorelowane ze zmianami w ruchach chloroplastów (Ryc. 20).

Generalnym wnioskiem płynącym z uzyskanych przez Doktorantkę wyników jest stwierdzenie, że auksyna uczestniczy w modulacji ruchów chloroplastów indukowanych światłem niebieskim, jednakże nie odgrywa ona pierwszoplanowej roli w przebiegu tego zjawiska. Zgadzam się z Autorką, że na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków, co do roli auksyny w regulacji ruchów chloroplastów. Czy więc przyjęto złe założenia pracy? W żadnym wypadku. Trzeba było wykonać takie właśnie badania, aby przekonać się o ich wyniku. Rodzi się jednak pytanie, które kieruję do Doktorantki, jakie inne badania należy wykonać, aby jednoznacznie wykluczyć lub potwierdzić udział auksyny w kontroli ruchów chloroplastów?

Mam także pewną wątpliwość dotyczącą samych założeń teoretycznych eksperymentów z dominacją wierzchołkową. Chociaż nie zostało to wyraźnie powiedziane, jestem przekonany, że Autorka wybierając taki model doświadczeń spodziewała się, że będzie mogła w określony sposób wpływać na stężenie auksyny w liściach. Tymczasem nie jest to takie oczywiste. Dekapitacja wyraźnie zmniejsza stężenie auksyny w części podwierzchołkowej w pędzie na skutek utraty źródła tego fitohormonu, ale inaczej jest w liściach, które same, szczególnie młode, mogą być donorami auksyny. Autorka sama wykazała, że nie istnieje ścisła zależność pomiędzy dekapitacją, dekapitacją i stosowaniem egzogennych auksyn a stężeniem auksyn w liściach. Świadczy to dobrze o rzetelności wykonywanych przez Doktorantkę badań. Znane już od przeszło 80 lat zjawisko dominacji wierzchołkowej ciągle jeszcze jest słabo poznane od strony molekularnej. Ostanie badania sugerują, że to nie auksyna jest pierwotnym przekaźnikiem w tym zjawisku a raczej zmiany jej stężenia są skutkiem zmian w dystrybucji cukrów w pędzie po dekapitacji. Jednakże w momencie, kiedy formułowane były postulaty pracy doktorskiej mgr Aleksandry Eckstein poglądy te były w powijakach. Chciałbym więc prosić Doktorantkę o próbę reinterpretacji niektórych uzyskanych wyników zakładając, że ten ostatni model jest prawdziwy - dekapitacja powoduje redystrybucję cukrów a wzrost stężenia auksyny w nowym dominującym organie jest środkiem do zwiększenia jego zdolności do pozyskiwania asymilatów.

Moje zastrzeżenia budzi także stosowanie przez Doktorantkę tzw. antyauksyn, w tym przypadku PCIB. Mechanizm działania tych substancji na roślinę jest bardzo zróżnicowany. Część z nich, w tym PCIB, to substancje będące syntetycznymi auksynami, zdolnymi aktywować szlak przekazu sygnału auksyny, który prowadzi do zmiany stężenia endogennych auksyn. Stąd interpretacja wyników jest utrudniona.

Mam też pewne problemy z uznaniem wartości zmierzonych stężeń auksyn w liściach. Inni Autorzy i moje własne doświadczenia sugerują, że są one trochę wyższe, ale może to kwestia zastosowanego standardu, albo sposobu przeliczenia. W żadnym stopniu nie wpływa to jednak na wartość uzyskanych wyników, gdyż były one zawsze odnoszone do mierzonej w ten sam sposób kontroli.

Ocena formalnej strony pracy

Prawność języka generalnie nie budzi zastrzeżeń. Praca napisana jest przejrzyście i zrozumiale. Autorka swobodnie posługuje się językiem fachowym i wykazała się umiejętnością krytycznej analizy przyjętych założeń. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej.

Jednakże w pracy znajduje się wiele błędów edytorskich. Najczęściej powtarzającym się błędem jest nierozpoczynanie zdania z wielkiej litery. Często brakuje polskich znaków diakrytycznych, przecinków, itp. Nierzadko też pojawiają zapożyczenia językowe i neologizmy (np. c-DNA – przetłumaczony jako DNA kodujący – str. 3; PMSF – jako fenylometylosulfonofluorek – str. 4; Cp-aktyna została zwizualizowana – str. 16; ustalanie wzorca wiązek przewodzących w liściu – str. 28, itp.), ale wydaje się, że jest to bolączka całego polskiego piśmiennictwa naukowego, szczególnie w naukach przyrodniczych. Niektóre pozycje wykazu literatury pisane są czcionką o innym rozmiarze.

Podsumowanie wnioski końcowe

Pomimo pewnych krytycznych uwag, przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Aleksandry Eckstein jest w sensie poznawczym pracą wartościową. Autorka osiągnęła zakładane cele i wykazała się dobrą znajomością literatury dotyczącej omawianych zagadnień. Wysoka wartość naukowa przeprowadzonego przez Doktorantkę procesu badawczego, zaowocowała opublikowaniem części uzyskanych wyników w czasopiśmie o wysokiej randze naukowej, jakim jest Physiologia Plantarum. Zważywszy na brak w polskim czasopiśmiennictwie informacji na temat ruchów chloroplastów, Autorka powinna rozważyć wydrukowanie części Wstępu w którymś z polskojęzycznych czasopism.

Biorąc pod uwagę powyższe, uważam, że rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Eckstein spełnia wszystkie wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późniejszymi zmianami, w brzmieniu ustalonym Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. (Dz.U. nr 84, poz, 455) i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ o dopuszczenie mgr Aleksandry Eckstein do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

(-) Dr hab. Jacek Kęsy