Prof. dr hab. Ireneusz Ślesak
prof. Instytutu Fizjologii Roślin
im. Franciszka Górskiego PAN
w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Piotra Zgłobickiego zatytułowanej:

„Modulacja odpowiedzi roślin na UV pod wpływem światła widzialnego i cukrów"

Większość organizmów żywych na Ziemi, a dotyczy to głównie tych żyjących na lądzie, wystawiona jest na działanie promieniowania ultrafioletowego (UV). Co więcej, dane geochemiczne wskazują, że populacje pierwotnych komórek, które pojawiły się na wczesnych etapach ewolucji życia na Ziemi, były najprawdopodobniej narażone na działanie znacznie większych dawek UV, niż obecnie żyjące organizmy. Można bez zbytniej przesady stwierdzić, że promieniowanie UV towarzyszy życiu na Ziemi już od jego zarania. Zatem, jego obecność wymagała wykształcenia przez różne grupy organizmów rozmaitych mechanizmów obronnych, które ograniczałyby lub, jak ma to miejsce w przypadku zmian w DNA, naprawiałyby uszkodzenia powstałe w wyniku działania promieniowania UV. **Dlatego badania przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej bardzo dobrze wpisują się we współczesne dociekania, które mają wyjaśnić mechanizmy odpowiedzi roślin na UV, ze szczególnym uwzględnieniem procesów naprawy DNA.**

OPIS FORMALNY PRACY DOKTORSKIEJ

Recenzowana rozprawa zawiera 125 stron maszynopisu i jest napisana w formacie typowym dla prac doktorskich. „Spis treści" poprzedza „Streszczenie" w j. polskim i angielskim oraz „Wykaz stosowanych skrótów". Sam „Wykaz stosowanych skrótów" ma 4,5 strony, ale bogactwo użytych przez Doktoranta skrótów sprawia, że tak obszerny ich wykaz był konieczny, aby ułatwić Czytelnikowi pełne zrozumienie tekstu rozprawy doktorskiej, który bardzo obficie jest naszpikowany rozmaitymi skrótami nazw genów, białek, inhibitorów itp.
"Streszczenie" zwięźle przedstawia tematykę pracy oraz uzyskane wyniki i jest dobrym wprowadzeniem do bardziej szczegółowych rozważań przedstawionych w dalszych częściach rozprawy. Bardzo obszerny „Wstęp" (32 strony) ma charakter aktualnego przeglądu literatury, który pozwala zapoznać się z głównymi zagadnieniami przedstawionymi w pracy doktorskiej, czyli zawiera opis: 1) oddziaływania promieniowania UV na organizmy żywe, 2) mechanizmów chroniących organizmy przed promieniowaniem UV i 3) roli cukrów w rozwoju roślin, ze szczególnym uwzględnieniem procesu kwitnienia. Na końcu „Wstępu" opisana jest rola UV w transdukcji sygnału świetlnego u roślin. Następnie jest rozdział „Cele pracy", po którym następuje opis zastosowanych materiałów i metod (rozdz. „Materiały i metody", 13 stron). Kolejne rozdziały to opis uzyskanych wyników (rozdz. „Wyniki", 29 stron) oraz ich dyskusja (rozdz. „Dyskusja", 12,5 strony), przeprowadzona w oparciu o dane literaturowe. Właściwą część pracy kończy „Podsumowanie", które *de facto* jest ostatnią częścią „Dyskusji" i obszerny, bo liczący prawie 300 pozycji spis literatury. Rozprawę uzupełnia „Dodatek" (2 strony), który zawiera szczegółowy opis składu chemicznego dwóch buforów, tabelę z wartościami osmolarności podłoży hodowlanych użytych w doświadczeniach oraz wybrane widma masowe związków polifenolowych uzyskanych po rozdziale chromatograficznym.

OPIS MERYTORYCZNY ROZPRAWY

Rośliny wyższe są szczególnie narażone na działanie UV, bo światło słoneczne jest dla nich niezbędne do przeprowadzania procesu fotosyntezy oksygenicznej. Ponadto, przez większość swojego cyklu życiowego przytwierdzone są do podłoża i nie mogą minimalizować negatywnych efektów działania nadmiaru światła poprzez zmianę położenia całego ciała. Stąd też, wywołane przez UV uszkodzenia DNA oraz inne, pośrednie efekty jego oddziaływania na roślinę mają kluczowe znaczenie dla jej prawidłowego wzrostu i rozwoju. Z drugiej strony, warto tutaj podkreślić, że u roślin promieniowanie

UV, w pewnym określonym zakresie, pełni również istotną funkcję w transdukcji sygnału świetlnego i tym samym może regulować wybrane procesy wzrostowe i rozwojowe roślin.
Dlatego badania nad mechanizmami, które prowadzą do ograniczania i/lub naprawy uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV, zwłaszcza w kontekście roli cukrów – jednego z głównych produktów fotosyntezy - należy uznać za podejście wskazane i nowatorskie. Tym bardziej, że zagadnienia, dotyczące roli cukrów w reakcji na działanie UV nie były dotychczas szczegółowo analizowane u roślin.

"Wstęp" i "Cele pracy"
W prezentowanej pracy Autor postawił sobie za cel sprawdzenie odpowiedzi roślin na promieniowanie UV, głównie w zakresie 280 – 315 nm, czyli tzw. promieniowanie UV-B. Cel ten realizowano w ramach dwóch modułów doświadczalnych, które miały zweryfikować hipotezy badawcze klarownie sformułowane w rozdz. „Cele pracy". **Pierwsza hipoteza** zakładała, że cukry i ich metabolizm, będzie miał znaczenie ochronne przed szkodliwym działaniem promieniowania UV poprzez zwiększoną aktywność systemu antyoksydacyjnego (antyoksydanty drobnocząsteczkowe), czy układu odpowiedzialnego za naprawę uszkodzeń i/lub naprawę DNA (ekspresja genów dla enzymów naprawiających DNA i aktywność tych enzymów). Weryfikację tej hipotezy Doktorant oparł na doświadczeniach *in vitro*. Rolę cukrów w odpowiedzi na promieniowanie UV badano w obecności egzogennie podanych cukrów: sacharozy (SUC) i glukozy (GLC), w stężeniach 1 i 3% (w/v), które zawarte były w podłożu hodowlanym, czyli pożywce Gamborga B5. Warianty kontrolne stanowiły rośliny rosnące na podłożu Gamborga bez cukru (B5∅) lub, aby wyeliminować efekty osmotyczne wywołane obecnością cukrów, na podłożu z mannitolem (MAN) w stężeniach, które odpowiadały osmolarności pożywek z 1 i 3% sacharozą i glukozą.
Drugą hipotezę oparł Autor na fakcie obecności DNA w chloroplastach i jądrze komórkowym, i założył, że indukowane światłem niebieskim kierunkowe ruchy chloroplastów i jądra komórkowego, zwłaszcza tzw. reakcja ucieczki tych organelli w odpowiedzi na działanie silnego światła niebieskiego (470 nm), będzie związana z ochroną zawartego w nich genomu. Hipoteza ta sprawdzana była na roślinach z kultur wazonowych. Dodatkowo, choć szkoda, że nie zostało to przez Doktoranta sformułowane *explicite* jako oddzielna hipoteza, zbadana została także potencjalna rola cukrów i UV w kwitnieniu, z uwzględnieniem potencjalnej roli specyficznego receptora dla promieniowania UV. Obiektem doświadczalnym był rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), roślina modelowa w szeroko pojętych badaniach z zakresu biologii eksperymentalnej roślin. *A. thaliana* jest gatunkiem o m. in. dobrze rozpoznanym mechanizmie ruchu chloroplastów. W pełni zsekwencjonowany genom i szeroki wachlarz dobrze zdefiniowanych mutantów u *A. thaliana*, pozwala prowadzić precyzyjne badania nad wybranymi zagadnieniami, które dotyczą mechanizmów wzrostu i rozwoju roślin oraz ich odpowiedzi na rozmaite czynnik stresowe. A badania takie w przypadku Arabidopsis można z powodzeniem prowadzić na różnych poziomach organizacji organizmu roślinnego, począwszy od ekspresji genów, a na reakcjach fizjologicznych całej rośliny kończąc. **Warto podkreślić, że wybór takiego, a nie innego gatunku rośliny oraz przejrzyste sformułowanie głównych hipotez badawczych świadczy o dojrzałości badawczej Doktoranta.**
W pierwszej części „Wstępu" zostały przedstawione dane na temat wpływu promieniowania UV na układy żywe. Na początku Czytelnik dowiaduje się, że promieniowanie UV, które dociera do powierzchni Ziemi, to przede wszystkim światło w zakresie długości fal 315 – 400 nm (tzw. UV-A) i 280-315 nm, czyli UV-B. Natomiast najgroźniejsze z nich, czyli UV-C, o długości fal w zakresie 100 - 280 nm, jest pochłaniane przez stratosferyczną warstw ozonową. Choć podział ten ma charakter umowny daje jasną informację o świetle UV, z którym stykają się organizmy żywe i jednocześnie sygnalizuje jaki rodzaj promieniowania UV będzie badany w pracy doktorskiej. Tutaj pozwolę sobie na drobną uwagę o charakterze merytoryczno-edytorskim. „Wstęp" bardzo obficie jest podzielony na akapity. Prawdopodobnie Autor chciał w ten sposób uzyskać dużą jasność opisywanych zagadnień. Niemniej jednak, w moim przekonaniu, nie wszędzie rozpoczynanie kolejnego fragmentu tekstu wymagało tak częstego stosowania akapitów, dodatkowo porozdzielanych pustymi wierszami. Przykładowo, na str. 14. (pierwsza strona „Wstępu") mamy aż trzy akapity, choć 2-gi z nich mógł być, bez utraty klarowności wywodu, połączony z trzecim. Strony 15, 21 i 28 mają aż po 3 akapity, często zawierające mniej niż 10 wierszy. Jeśli takie „poszatkowanie" tekstu akapitami było uzasadnione, to przynajmniej można było ich nie rozdzielać dodatkowymi wierszami. Drugą kwestią

jest zdarzający się brak cytowania literatury na końcu danego akapitu. Nawet jeśli przedstawiane informacje wydają się mieć charakter podstawowy, to powinny być poparte zacytowaniem jakiejś pozycji literaturowej, choćby podręcznika. Przykładów również dostarcza str. 14, np. 1-szy akapit z opisem rodzajów promieniowania UV, a na jego końcu brak jest odniesienia do literatury, a przecież klasyfikacja promieniowania UV na: UV-A, UV-B i UV-C została zapewne zaczerpnięta z literatury. Po krótkiej charakterystyce promieniowania UV, Doktorant przechodzi do omówienia bezpośrednich i pośrednich efektów oddziaływania UV na organizmy żywe. Do tych pierwszych zalicza fotouszkodzenia DNA, a nadprodukcję ROS opisuje jako efekt wtórny działania tego typu promieniowania na komórkę. W kolejnej części opisywane są trzy podstawowe mechanizmy ochronne przed negatywnym działaniem UV: 1) unikanie nadmiaru UV, 2) wytwarzanie substancji barwnikowych o charakterze fotoprotekcyjnym i 3) naprawa uszkodzeń DNA wywołanych przez UV. W krótkim wprowadzeniu do mechanizmów ochrony przed UV nie wspomniano o układzie antyoksydacyjm, choć jest on bardziej szczegółowo opisywany w dalszej części „Wstępu", w pkt. 1.2.4 (str. 22). W opisie sposobów unikania ekspozycji na nadmiar promieniowania UV-B (pkt. 1.2.1) Doktorant klarownie przedstawił fotoindukowane ruchy chloroplastów oraz jąder komórkowych. W dalszej kolejności uwypuklona została ochronna rola substancji silnie absorbujących promieniowanie UV, takich jak: flawonoidy czy pochodne kwasów hydroksycynamonowych. Autor opisuje ich występowanie u roślin i geny zaangażowane w regulację biosyntezy tych związków, szczególnie w kontekście odpowiedzi na promieniowanie UV. Dalsza część opisu mechanizmów ochronnych przed UV dotyczy układu antyoksydacyjnego, gdzie w zwięzły sposób zaprezentowane są główne drobnocząsteczkowe (nieenzymatyczne) i enzymatyczne komponenty systemu antyoksydacyjnego komórki roślinnej. Najobszerniejszą część „Wstępu" (9 stron) stanowi opis funkcjonujących w roślinach systemów naprawy DNA. Jako pierwsze opisywane są mechanizmy naprawy DNA w oparciu o fotoreaktywację, którą przeprowadzają enzymy z grupy fotoliaz, czyli tzw. fotoliazy pirymidynowych dimerów cyklobutylowych (fotoliazy CPD) oraz fotoliazy fotoproduktów pirymidyno [6-4]pirymidonowych (fotoliazy 6-4 PP). Jak podkreśla Autor, fotoliazy są jedynymi enzymami naprawczymi, które naprawiają dimery pirymidynowe powstałe w rezultacie bezpośredniego działania promieniowania UV na DNA. Kolejna część pracy przedstawia Czytelnikowi mechanizmy naprawy DNA niezależne od światła. Szczegółowo opisana jest naprawa DNA przez: 1) wycięcie zasad azotowych, 2) wycięcie nukleotydów, 3) naprawę tzw. pęknięć dwuniciowych, 4) łączenie końców niehomologicznych, czy 5) rekombinację homologiczną. Naprawa błędnie sparowanych zasad jest ostatnim, niezależnym od światła mechanizmem naprawy DNA, który został przedstawiony w recenzowanej rozprawie doktorskiej. **Warto podkreślić, że prezentowane metody naprawy materiału genetycznego, nawet te niezależne od światła, są zazwyczaj opisywane w kontekście działania promieniowania UV na rośliny, ze szczególnym uwzględnieniem danych, jakie uzyskano dotychczas na ten temat u *A. thaliana*.** W kolejnej części „Wstępu" przedstawiony jest aktualny stan wiedzy nt. roli cukrów we wzroście i rozwoju roślin. Szczególny nacisk położony został na receptorowo-sygnalizacyjną rolę węglowodanów, głównie glukozy i sacharozy, które są najpowszechniej występującymi metabolitami cukrowymi w tkankach roślinnych. Mogą one, wraz z pochodną trehalozy tj. trehalozo-6-fosforanem wchodzić w interakcje z określonymi kinazami i/lub czynnikami transkrypcyjnymi, a tym samym regulować tzw. „poziom energetyczny komórki". W następnej części pracy Doktorant koncentruje się na opisie regulacji kwitnienia roślin, ze szczególnym uwzględnieniem takich cząstkowych, a zarazem kluczowych dla kwitnienia procesów, jak fotosynteza oraz ekspresja genów i aktywność białek CO (ang. CONSTANS) i FT (ang. FLOWERING TIME), które regulują kwitnienie u *A. thaliana*. Ostatnia część „Wstępu" prezentuje promieniowanie UV, a ściślej UV-B, jako czynnik, który za pośrednictwem specyficznego fotoreceptora UVR8 pełni funkcję sygnalizacyjną w procesach wzrostu i rozwoju roślin. Zestawienie zagadnień związanych z kwitnieniem i sygnalizacyjną funkcją UV-B na samym końcu „Wstępu" stanowi dla Czytelnika dobre wprowadzenie w badania, które dotyczyły potencjalnej roli receptora UVR8 w kwitnieniu *A. thaliana*. Czytelne schematy są często bardziej informatywne niż obszerne i specjalistyczne opisy słowne. Dlatego szkoda, że we „Wstępie" nie ma żadnych ilustracji czy schematów, które mogłyby być dobrym uzupełnieniem dla wybranych zagadnień opisywanych przez Doktoranta, np. tych związanych z fotoindukowanymi ruchami organelli czy naprawą DNA.

"Materiały i metody"
Rozdział ten został napisany w sposób przejrzysty i zwięzły, a na pochwałę zasługuje strona ilustracyjna. Co prawda, pewne zaskoczenie budzi rozpoczynanie rozdziału rysunkiem (rys. 1), bez jakiegokolwiek zdania wprowadzenia czy komentarza. Niemniej jednak, wspomniany powyżej rys. 1, pokazujący schemat wykonanych badań, znacznie ułatwia podążanie za tokiem wywodu przedstawionego w kolejnych częściach rozprawy doktorskiej. **Z uznaniem należy także podkreślić, że podwójny mutant fototropinowy *phot1phot2* został na potrzeby planowanych badań własnoręcznie uzyskany przez Doktoranta.** Inne szczegółowe uwagi i komentarze zawarłem w części recenzji, która zbiorczo przedstawia te kwestie w odniesieniu do wszystkich rozdziałów rozprawy doktorskiej.

"Wyniki", "Dyskusja" i "Podsumowanie"
Rola egzogennie podanych cukrów w odpowiedzi roślin na promieniowanie UV nie była dotychczas szczegółowo analizowana i nie została w dostateczny sposób rozpoznana. **Fakt ten wart jest podkreślenia, bo świadczy o dużym nowatorstwie podjętych przez Doktoranta badań.** Choć przeprowadzone doświadczenia wymagały zastosowania kultur *in vitro*, które odbiegają od bardziej zbliżonej do warunków naturalnych hodowli ziemnej, to uzyskane wyniki mogą być również wskazówką i zaczynem do badań nad rolą endogennych cukrów w odpowiedzi roślin na stres wywołany przez UV.
Już wizualna ocena morfologii roślin *A. thaliana* pozwoliła stwierdzić, że obecność obu rodzajów cukru w podłożu hodowlanym pozytywnie wpływała na wzrost roślin oraz do pewnego stopnia ograniczała toksyczne oddziaływanie UV-B. Analiza ilościowa pokazała, że najwięcej martwych i uszkodzonych roślin było na pożywce bezcukrowej oraz izoosmotycznych kontrolach z mannitolem. Spośród cukrów najwyraźniejsze działanie ochronne przed UV zanotowano dla glukozy w obydwu zastosowanych stężeniach. Co ciekawe, wcześniejsze naświetlanie roślin UV na podłożach z sacharozą powodowało wzrost liczby pędów generatywnych, których liczbę przyjęto za miarę rozpoczynającego się procesu kwitnienia. Ta ciekawa obserwacja skłoniła Doktoranta do próby wyjaśnienia tego zjawiska przez sprawdzenie czy w przyspieszone kwitnienie, indukowane przez UV-B, nie jest zaangażowany receptor światła UV-B, tzw. UVR8. Doświadczenia na mutantach Arabidopsis *uvr8* nie wykazały jego udziału w zależnym od UV przyśpieszonym kwitnieniu *A. thaliana* w kulturze *in vitro*. W dalszej kolejności sprawdzono ekspresję genów *CO* i *FT*, które biorą udział w indukcji kwitnienia. Uzyskane wyniki pokazały, że *CO* może w pewnym stopniu być zaangażowany w zależne od UV-B kwitnienie na podłożu z sacharozą (1%) oraz glukozą (3%). Zwiększoną ekspresję genu *FT* zaobserwowano jedynie na podłożach suplementowanych cukrami, natomiast brak było efektu działania UV-B. W kolejnym etapie badań sprawdzono czy same cukry w podłożu wpływają na poziom barwników fotosyntetycznych. Wyraźny wzrost zawartości karotenoidów: β-karotenu, luteiny, neoksantyny, wiolaksantyny oraz chlorofili: chlorofilu *a* (chl *a*) i *b* (chl *b*) stwierdzono dla roślin na podłożach z cukrami, głównie sacharozą (3%) i glukozą (3%). Jeśli jednak poziom ww. barwników wyrażono jako znormalizowany względem chlorofili to, z wyjątkiem wiolaksantyny, nie zaobserwowano różnic pomiędzy pożywką bezcukrową (kontrola), a tą z cukrami. Szkoda, że Doktorant, oprócz opisu wyników, nie wyjaśnił po co zastosowano normalizację i co takie rozbieżne wyniki oznaczają dla funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego. Naświetlanie niższą dawką UV (2,5 kJ m^{-2}) nie miało żadnego efektu na wartość parametru Fv/Fm, niezależnie od rodzaju cukru zastosowanego w podłożu (rys. 11A). Również naświetlanie większą dawką UV (28 kJ m^{-2}) nie powodowało istotnych zmian w wartości Fv/Fm w porównaniu do bezcukrowej kontroli (rys. 11B) (inne szczegółowe komentarze, dotyczące tej części zawarto w uwagach do strony edycyjno-merytorycznej rozprawy). Ciekawym wynikiem był wzrost Fv/Fm dla nienaświetlanych roślin (kontrola) na podłożu z mannitolem, sacharozą i glukozą (rys. 11B). Zwłaszcza, podniesioną względem bezcukrowej kontroli, wartość Fv/Fm dla sacharozy (3%) można łączyć z obserwowanym wcześniej zwiększonym poziomem chl *a* u roślin rosnących na tym podłożu (rys. 9E, rys. 11B). W kolejnym etapie sprawdzono, jak cukier w podłożu wpływał na zawartość wybranych chloroplastowych przeciwutleniaczy. Sacharoza obniżała zawartość γ-tokoferolu oraz plastochromanolu-8. Z kolei w obecności glukozy (3%) dodatkowo spadał także poziom α-tokoferolu i plastochinonu-9 (rys. 12). Analiza innych drobnocząsteczkowych antyoksydantów, takich jak pochodne kemferolu, kwercetyny czy jabłczan synapoilu pokazała, że wzrost ich zawartości

obserwowano w roślinach na podłożu z glukozą (3%). W badaniach nad fotoliazami wykazano, że gen dla fotoliazy 6-4 fotoproduktów miał najniższy poziom ekspresji w obecności glukozy (3%). Wynik ten, w połączeniu ze zwiększoną zawartością badanych związków polifenolowych, np. pochodnych kemferolu, sugeruje, że substancje te mogą skutecznie absorbować promieniowanie UV i ograniczać wywoływane przez nie uszkodzenia DNA. **Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że Doktorant, oprócz fotoliaz, przebadał także aktywność innych wybranych genów, których produkty białkowe zaangażowane są w mechanizmy naprawy DNA niezależne od światła.** Na przykład, rodzaj i stężenie cukru w podłożu nie miało wpływu na poziom ekspresji genów endonukleaz AP (*APE1L* i *APE2*) odpowiedzialnych za naprawę DNA przez wycięcie zasady azotowej. W przypadku genów kodujących białka zaangażowane w naprawę DNA przez wycięcie całego nukleotydu, dwa spośród pięciu przebadanych genów miały zwiększoną ekspresję w obecności cukrów; *DDB1A* na podłożu z sacharozą (1 i 3%) i glukozą (1%) oraz *RAD23A* na podłożu z sacharozą (3%) i glukozą (1 i 3%). Wśród genów reperujących DNA w ramach rekombinacji homologicznej tylko *RAD51*wykazywał wyższą ekspresję w obecności glukozy (3%). Z kolei *MSH7*, jako gen biorący udział w naprawie błędnie sparowanych nukleotydów, był aktywowany na pożywce z sacharozą i glukozą (3%). W ostatniej grupie genów, które kodują białka odpowiedzialne za reperowane błędnie sparowanych zasad w DNA, jedna z gyraz (*GYRA*) oraz *PCNA1* i *PCNA2* miały większą ekspresję w obecności glukozy (3%). *PCNA2* był też aktywowany przez sacharozę (3%), a *PCNA1* w obecności wszystkich rodzajów i stężeń zastosowanych cukrów. Uzyskany obraz systemu naprawy uszkodzeń DNA został uzupełniony pomiarami poziomu uszkodzonych przez UV zasad pirymidynowych, czyli pirymidynowego dimeru cyklobutylowego (CPD) oraz 6-4 fotoproduktów (6-4 PP). Względne ilości CPD i 6-4PP odzwierciedlały *de facto* aktywność fotoliaz. Obniżony poziom CPD i 6-4 PP stwierdzono u roślin rosnących na podłożu z glukozą (3%) oraz w izoosmotycznej kontroli z mannitolem (3%). Dodatkowo, CPD było mniej u roślin z pożywki z sacharozą (3%) w porównaniu do bezcukrowej kontroli (B5∅). Wynik ten wskazuje, że cukry, a zwłaszcza glukoza w jakiś sposób wpływają na wzrost aktywności fotoliaz CPD i 6-4 PP. Uzyskane rezultaty wskazują też, że regulacja aktywności fotoliaz 6-4 fotoproduktów nie odbywa się prawdopodobnie na poziomie transkrypcji, bo na pożywce z glukozą (3%) aktywność genu *UVR3* dla tego typu fotoliazy była niższa niż w kontroli (B5∅).

W kolejnych eksperymentach sprawdzano czy obecność danego cukru w podłożu ma wpływ na zależną i niezależną od światła niebieskiego (470 nm) naprawę DNA u roślin, które były wcześniej eksponowane na promieniowanie UV-B. Uzyskane wyniki, choć nie wykonano w tym wypadku analizy statystycznej, wskazują, że fotonaprawa DNA zależna od fotoliazy CPD, a szczególnie fotoliazy 6-4 PP wyraźnie wzrastała w roślinach naświetlanych światłem niebieskim, w porównaniu do tych z ciemności (rys. 20A vs. 20B oraz rys. 20C vs. 20D). Świadczył o tym spadek względnej zawartości, odpowiednio CPD i 6-4 PP. Porównanie wydajności naprawy DNA na podłożach z cukrami nie wykazało żadnych różnic względem bezcukrowej kontroli (B5∅), ani w przypadku roślin z warunków ciemnościowych ani tych eksponowanych na światło niebieskie. Natomiast ciekawą obserwacją było pokazanie, że obecność cukrów (3%) w podłożu wiązała się ze zwiększoną, niezależną od światła naprawą DNA (warunki ciemnościowe), w porównaniu do izoosmotycznej kontroli z mannitolem (rys. 20A, C). Na tej podstawie Doktorant wyciągnął wniosek, że o ile cukry w medium hodowlanym nie wpływały na fotonaprawę DNA, to zwiększały wydajność „ciemnościowych" mechanizmów naprawczych. Niemniej jednak wniosek ten, w kontekście przeprowadzonych doświadczeń, może być sumptem do szerszej dyskusji na temat potencjalnej roli cukrów w naprawie DNA i dogłębnej interpretacji uzyskanych wyników. Wynika to z faktu, że stopień uszkodzeń DNA, których miarą był poziom CPD i 6-4 PP nie różnił się na podłożach cukrowych względem bezcukrowej kontroli (rys. 20A, C). Jedyna różnica, wspomniana powyżej, dotyczyła porównania obecności cukru w pożywce z odpowiadającym mu mannitolowym izoosmotikum. Zatem, można domniemywać, że to nie rodzaj cukru lub przynajmniej nie tylko on, ale także mannitol mógł mieć jakiś wpływ na „ciemnościową" naprawę DNA u *A. thaliana* po uprzednim naświetlaniu UV.

Analiza fotoindukowanych ruchów chloroplastów i jąder komórkowych w mezofilu liści *A. thaliana*, z wykorzystaniem mutantów z zaburzonymi fototranslokacjami chloroplastów, nie wykazała, że ruchy tych organelli, szczególnie w odpowiedzi na silne światło, będą ograniczały uszkodzenia DNA wywołane działaniem promieniowania UV. U żadnego z przebadanych mutantów, w porównaniu do

roślin dzikiego typu, nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomie CPD i 6-4 PP. Wynik ten świadczy o tym, że przemieszczanie się chloroplastów i jądra komórkowego, w odpowiedzi na kierunek i natężenie padającego na liść światła, nie jest związane z fotoprotekcją zawartego w tych organellach DNA. „Dyskusja" napisana jest poprawnie i Doktorant przeprowadził ją z uwzględnieniem odpowiednio dobranych danych literaturowych. Świadczy to o dogłębnym rozeznaniu Autora w problematyce badawczej poruszanej w rozprawie. Drobnym zarzutem do tej części doktoratu, jako pewnej odrębnej całości, są pojawiające się zbyt obszerne, jak na „Dyskusję", powtórne opisy uzyskanych rezultatów. Na zakończenie Doktorant przedstawił podsumowanie wyników (str. 101). Szkoda, że nie zostało ono wyodrębnione, jako osobny rozdział z wypunktowanymi wnioskami, tylko stanowi ostatni fragment „Dyskusji", bo w mojej ocenie traci przez to nieco na przejrzystości. Niemniej jednak, wyciągnięte wnioski są poprawne, a jedynie drobne wątpliwości mogą być przyczynkiem do dyskusji i dalszych badań. Jedynym wnioskiem, o który mogłoby być wzbogacone podsumowanie, to stwierdzenie, że fotoindukowane ruchy chloroplastów i jądra komórkowego nie mają znaczenia w ochronie DNA zawartego w tych organellach przed promieniowaniem UV-B.
Uzyskane rezultaty nie wyczerpują oczywiście zagadnienia roli cukrów w naprawie DNA uszkodzonego przez UV czy zaangażowania cukrów i promieniowania UV w indukcję kwitnienia u *A. thaliana*. Zresztą sam Doktorant słusznie nadmienia, że dodatkowego sprawdzenia wymagałoby chociażby określenie czy cukry zawarte w podłożu oddziałują na enzymatyczny układ antyoksydacyjny oraz, czy w proces kwitnienia nie są zaangażowane inne metabolity np. kwas salicylowy.

UWAGI DO STRONY MERYTORYCZNEJ ROZPRAWY

Poniżej pozwolę sobie przytoczyć garść uwag krytycznych, z których część dotyczy niejednoznacznych sformułowań czy użytych terminów i ma charakter propozycji oraz pytań do dyskusji.

Uwagi do rozdziału "Wstęp"

1. Str.: 15, 16, 17, 23: używany jest nieprecyzyjny termin „rodnik tlenowy". Prawdopodobnie chodziło o reaktywną formę tlenu powstałą po jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego (O_2) do tzw. „anionorodnika ponadtlenkowego (ang. superoxide anion radical, $O_2^{\bullet-}$)". Co ciekawe, na str. 43 Doktorant użył określenia „rodnik ponadtlenkowy" (ang. superoxide radical), które jest już bardziej precyzyjnym terminem, określającym tę formę ROS niż sformułowanie „rodnik tlenowy".
2. Na str. 35 pojawia się sformułowanie „sensory komórkowego poziomu energetycznego". **Co należy rozumieć przez określenie „komórkowy poziom energetyczny"? Termin ten nie został wyjaśniony w tekście pracy.**

Uwagi do rozdziału "Materiały i metody"

1. Na str. 48 wymienione są wszystkie mutanty użyte w pracy, wraz z zaznaczaniem z jakiej linii pochodzą. Nie do końca jest jednak jasne czy były to mutanty typu „null", czyli z całkowitym brakiem funkcji wskazanego genu (np. brak jego transkrypcji), czy raczej mutanty ze zredukowaną (ograniczoną) ekspresją danego genu. **W związku z tym mam pytanie czy dla konkretnego zestawu nasion sprawdzano losowo poziom ekspresji genów, których dotyczą te mutanty?**
2. Na str. 53 napisano, że wskaźnikiem kwitnienia u *A. thaliana* było pojawienie się pędu kwiatowego, a nie samych kwiatów. **Może lepszym sformułowaniem w tym wypadku byłoby nie „kwitnienie" tylko „rozpoczęcie procesu kwitnienia"?**

Uwagi do rozdziałów "Wyniki" i "Dyskusja"

1. Zdanie w na str. 33 stwierdza, iż „wszystkie związki organiczne w organizmach żywych zawierają węgiel związany w cyklu Calvina-Bensona". Lepszym sformułowaniem byłoby stwierdzenie, że „większość związków organicznych" zawiera węgiel związany w cyklu Calvina-Bensona albowiem w wybranych grupach bakterii i archeonów opisano jeszcze 4 inne szlaki metaboliczne, w których wiązany jest CO_2 np. redukcyjny cykl kwasów trójkarboksylowych czy redukcyjny szlak acetylo-CoA.
2. Niektóre opisy, dotyczące wyników są częściowo niejasne i utrudniają czytanie pewnych fragmentów dysertacji doktorskiej. Poniżej pozwalam sobie wymienić kilka przykładów ze strony 73,

gdzie opisywano wyniki dotyczące maksymalnej fotochemicznej wydajności kwantowej PSII, czyli Fv/Fm.
Zaraz na początku tej strony Autor stwierdza, że „Krótka ekspozycja na UV (2,5 kJ·m^{-2}) w niewielkim stopniu obniża wydajność kwantową fotosystemu II w przypadku roślin hodowanych na 1% glukozie, 1% i 3% sacharozie oraz wszystkich używanych stężeniach mannitolu (0,53%, 1%, 1,6% i 3%) (rys.11A)." i w ogóle nie komentuje zaznaczonych na rys. 11A istotności statystycznych pomiędzy niektórymi średnimi np. SUC3 vs. MAN1,6 czy GLC3 vs. MAN3
Nieco dalej napisano: „Przy dłuższym, 1-godzinnym naświetlaniu (28 kJ·m^{-2}) […]". Po pierwsze, nie napisano *explicite*, że chodzi o naświetlanie światłem UV. Po drugie, zgodnie z informacjami z rozdz. „Materiały i Metody" (str. 51-52), dawką UV o mocy 28 kJ·m^{-2} naświetlano rośliny przez 5 min., a nie przez 1 godz. Dobrym i czytelnym rozwiązaniem byłoby zaznaczenie czasu ekspozycji roślin na UV w opisie rys. 11.
W innym zdaniu: „Wszystkie różnice między roślinami naświetlanymi i nienaświetlanymi były istotne statystycznie przy $P < 0,001$" To stwierdzenie jest niejasne w odniesieniu do rys. 11B. Zaznaczone na rys. 11B poziomy istotności statystycznej, czyli gwiazdki nad słupkami średnich wartości dla Fv/Fm mogą wskazywać, że odnoszą się one do średnich pomiędzy roślinami kontrolnymi (nienaświetlanymi UV), z podłoża cukrowego względem próbek bezcukrowych (B5∅), również nienaświetlanych UV. Jednak opis rys. 11, wskazuje, że zaznaczony poziom istotności statystycznej dotyczy tylko roślin naświetlanych UV. Poza tym nie wszystkie zaznaczone istotności statystyczne odpowiadają „$P < 0,001$", czyli 3 gwiazdkom nad słupkami średnich wartości Fv/Fm z rys. 11. Co ciekawe, istotności statystyczne pomiędzy średnimi dla roślin kontrolnych (nienaświetlanych UV) z podłoża cukrowego względem izoosmotycznych kontroli z mannitolem zaznaczono znacznie klarowniej.
Zdania na tej samej stronie: „Mniejszy spadek Fv/Fm był zaobserwowany dla podłoża z cukrem niż dla podłoża z mannitolem w przypadku par SUC3 – MAN1,6; GLC1 – MAN1 i GLC3 – MAN3. Dla pary SUC1 – MAN0,53 zaobserwowano efekt przeciwny, spadek Fv/Fm był mniejszy dla roślin z podłoża z mannitolem (rys. 11B). Powyższe różnice były istotne statystycznie." Ten fragment nie powinien się odnosić do porównywanej pary „GLC3 – MAN3", bo tam różnice, zgodnie z zaznaczoną na rys. 11B istotnością statystyczną, odnoszą się do par: bezcukrowa (B5∅) i nienaświetlana UV kontrola względem nienaświetlanych UV roślin na podłożu GLC3 i MAN3.
Pragnąłbym podkreślić, iż powyższe uwagi mają charakter wskazówek, które powinny być ewentualnie uwzględnione, jeśli wyniki lub ich część będą przygotowywane do publikacji.
3. Na rys. 9, 10 i 14 (str. 69, 70 i 78) przedstawiono dane dotyczące zawartości barwników fotosyntetycznych (rys. 9 i 10) i związków polifenolowych (rys. 14) w *A. thaliana*, w zależności od zawartości i rodzaju cukru w podłożu. Nie jest jasne dlaczego w tych doświadczeniach nie zastosowano izoosmotycznych kontroli z mannitolem, tak jak to miało miejsce chociażby w doświadczeniu z pomiarami parametru fluorescencyjnego Fv/Fm, którego wartość jest m. in. ściśle powiązana z barwnikami fotosyntetycznymi, a zwłaszcza zawartością chl *a* zaprezentowaną na rys. 9E. **Zatem, pojawia się pytanie dlaczego w tym wypadku podłoży z mannitolem nie zastosowano?**
4. Rys. 15 (str. 80): sprawdzono tylko poziom ekspresji genu dla fotoliazy 6-4 fotoproduktów (*UVR3*), natomiast nie określono ekspresji np. genu *PHR1* dla fotoliazy typu CPD. Natomiast mierzony był poziom CPD (rys. 19A), świadczący o aktywności tego typu fotoliazy. **Zatem, pojawia się pytanie, z jakiego powodu nie zbadano poziomu ekspresji genu dla fotoliazy CPD?**
5. Na str. 94 w ostatnim zdaniu stwierdzono: „Można więc przypuszczać, że mechanizm indukcji kwitnienia w naszym doświadczeniu był inny, być może zależny był on od kwasu salicylowego (Martínez et al., 2003)." To dość interesujące przypuszczenie, które sugeruje zaangażowanie kwasu salicylowego w proces kwitnienia u *A. thalina*. Szkoda, że Autor poprzestał na tak lakonicznym stwierdzeniu i nie rozwinął tej myśli w formie 2-3 zdań wyjaśnienia. **Przeto, na czym miałaby polegać hipotetyczna rola kwasu salicylowego w kwitnieniu Arabidopsis, w opisywanym układzie doświadczalnym?**

OCENA STRONY EDYTORSKIEJ PRACY DOKTORSKIEJ

Generalnie, praca napisana jest językiem poprawnym i jasnym. Niemniej, Doktorant nie ustrzegł się błędów, z których najważniejsze pozwalam sobie przytoczyć poniżej. Chciałbym jednocześnie podkreślić, że **nie muszą one być dyskutowane**, a przytaczam je li tylko z recenzenckiego

obowiązku. Nielicznych błędów o charakterze gramatycznym, interpunkcyjnym oraz tzw. literówek nie wymieniam.

Uwagi do strony edycyjnej rozprawy

1. NADPH jest na tyle typowym związkiem, podobnie jak np. ATP, że umieszczanie go w wykazie skrótów jest niepotrzebne.
2. Niedostateczne cytowanie literatury.
- na końcu ostatniego zdania na str. 14 powinna być zacytowana jakaś pozycja literaturowa,
- koniec 1-szego akapitu na str. 15 – brak cytacji literatury,
- str. 17, podrozdział „1.2. Ochrona przed działaniem UV" i „1.2.1. Unikanie UV" – brak cytacji literatury,
- str. 24, podrozdział „1.2.5. Naprawa DNA" – brak cytacji literatury,
- str. 25, ostatnie zdanie drugiego akapitu – brak cytacji literatury,
- str. 26, podrozdział „1.2.5.2 Mechanizmy naprawy DNA niezależne od światła" – brak cytacji literatury,
- str. 33, w podrozdziale „1.3. Rola cukrów w rozwoju roślin" i str. 36, podrozdział „1.4. Regulacja kwitnienia roślin" - brak jakichkolwiek odniesień do literatury.
- str. 92, na końcu zdania: „Te cztery związki uczestniczą w ochronie antyoksydacyjnej roślin, przede wszystkim chronią przez peroksydacją lipidów błonowych w chloroplastach i zmiatają ROS powstające w PSI i PSII." Powinna być zacytowana jakaś pozycja literaturowa.
3. Str. 41, brak w wykazie skrótów rozwinięcia skrótu „iRNA".
4. Str. 42, nieprecyzyjny tytuł podrozdziału 1.5.1 tzn. powinno być napisane o regulację czego (np. jakiego procesu, ekspresję genów itp.) chodzi.
5. Str. 43, oprócz nazw potocznych roślin (ogórek, fasola), powinny być także podane ich nazwy łacińskie.
6. Str. 44, ostatnie zdanie jest niepełne, bo skoro piszemy o „działaniu synergistycznym", to muszą być co najmniej dwa komponenty, które na takie działanie się składają. W tym wypadku chodzi zapewne o działanie światła niebieskiego i promieniowanie UV-B.
7. Str. 45, w drugim zdaniu, w podrozdziale 1.5.4.1 Autor pisze o „[...] ekspresji tego genu pod wpływem innych czynników.", ale nie wiadomo o jakie czynniki chodzi, bo nie podano żadnych przykładów.
8. Str. 49, Autor stwierdza, że homozygotyczność względem *PHOT1* i *PHOT2* sprawdzano wg „standardowej procedury", ale nie cytuje żadnej pozycji literaturowej, gdzie ta procedura była już opisana.
9. Na str. 55 sformułowanie o „spodziewanym" rozmieszczeniu chloroplastów i jądra komórkowego (rys. 3) jest trochę niejasne, bo sugeruje, że eksperymentator nie do końca miał pod kontrolą zjawisko fototranslokacji chloroplastów i jądra komórkowego w liściach *A. thaliana*. O ile dla jąder komórkowych określenie ich rozmieszczenia w komórkach, w przypadku całych liści nie jest możliwe (lub znacznie trudniejsze) i można tutaj mówić o „spodziewanym rozmieszczeniu", posiłkując się np. danymi literaturowymi, o tyle w przypadku chloroplastów Doktorant sprawdzał reakcję ucieczki i akumulacji chloroplastów metodą fotometryczną, o czym wspomina na str. 49.
10. Tabela 1 i 2. Opisy tabel zazwyczaj umieszcza się nad tabelami, a nie pod nimi. W ostatniej kolumnie, w tabeli 1 i 2, powinno być napisane, że chodzi o „temperaturę przyłączania starterów".
11. Str. 59, zamiast określenia „próbki były grzane" lepiej użyć sformułowania „próbki były podgrzewane".
12. Str. 62 i 63, błędna numeracja rysunków. Zamiast rys. 1 i rys. 2 powinno być rys. 4 i rys. 5. Dobrym wskaźnikiem wielkości roślin zaprezentowanych na rys. 1 i rys. 2 byłoby zamieszczenie na fotografiach podziałki ze skalą. Ponadto, w opisie ww. rysunków można było podać dawkę UV zastosowaną do naświetlania roślin.
13. Rys. 13, przedstawiający chromatogram, ma nieopisane osie XY oraz w jego opisie nie wyjaśniono, co oznaczają liczby nad poszczególnymi maksimami. Poza tym, opis zidentyfikowanych związków polifenolowych nie do końca pokrywa się z tym co przedstawiono na rys. 22, który zamieszczono w „Dodatku". Na przykład, na str. 76 opisuje się maksimum absorbancji dla związku nr 5 i *de facto* niewiadomo jakiej próbce na rys. 22 to maksimum odpowiada.

14. Rys. 14, legenda nie jest już potrzebna skoro opis poszczególnych próbek umieszczono pod słupkami.
15. Rys. 15, 16, 17 i 18, nazwy genów przy poszczególnych wykresach słupkowych, zgodnie z przyjętą konwencja, powinny być pisane kursywą. Ponadto, brak wyjaśnienia skrótów GYRA i GYRB1 (nie ma ich w opisie skrótów).
16. Rys. 20, zaznaczony poziom istotności statystycznej dotyczy tylko par cukier – izoosmotyczna kontrola z mannitolem, a nie jak podano w opisie rysunku także różnic pomiędzy bezcukrową kontrolą (B5∅) i roślinami z podłoży z sacharozą lub glukozą.
17. Rys. 21, brak w wykazie stosowanych skrótów „WB" i „SB".
18. Str. 124, powinno być: „Bufor do zawieszania jąder komórkowych".
19. Str. 125, na rys. 22 wykresy z poszczególnymi widmami masowymi poszczególnych próbek powinny być oznaczone literami: A, B, C i D, tak jak to jest przedstawione w opisie rysunku.

PODSUMOWANIE

Recenzowana rozprawa ma charakter pionierski albowiem podejmuje temat wcześniej niebadany, czyli rolę cukrów w reakcji roślin na promieniowanie UV-B, ze szczególnym uwzględnieniem zależnych od światła mechanizmów naprawy DNA. Zatem, poziom nowości naukowej w niej zawarty należy ocenić bardzo wysoko. Inną istotną rzeczą w ocenie pracy naukowej jest to, czy otwiera ona drogę do dalszych badań poprzez formułowanie kolejnych hipotez i projektowanie nowych doświadczeń. Oceniana rozprawa spełnia również ten warunek, bo sugeruje wiele pytań, które czekają na odpowiedź i mogą być zaczynem do nowych badań.

W moim przekonaniu najbardziej wartościowe wyniki uzyskane w pracy doktorskiej Pana mgr. Piotra Zgłobickiego to wykazanie, że egzogenne cukry sacharoza i glukoza mają efekt ochronny przed działaniem UV. Wyjaśnienie mechanizmu ochronnej funkcji cukrów w odpowiedzi na promieniowanie UV wymaga dalszych badań, choć otrzymane przez Doktoranta wyniki wskazują na udział w tym procesie związków polifenolowych i mniejszego poziomu uszkodzeń w DNA. Oryginalnym osiągnięciem doktoranta jest również wykazanie, że fotoindukowane ruchy chloroplastów i jądra komórkowego nie pełnią roli w ochronie DNA zawartego w tych organellach przed promieniowaniem UV-B.

Szczególne uznanie budzi metodologia przeprowadzonych badań, która wymagała zastosowania szerokiego wachlarza technik badawczych, takich jak: fotometryczne pomiary ruchu chloroplastów, fluorymetryczne pomiary fluorescencji chlorofilu *a* z PSII czy PCR w czasie rzeczywistym, co czyni przedstawioną pracę bardzo wszechstronną. Należy podkreślić, że Doktorant wykonał ogromną pracę, zarówno eksperymentalną jak i interpretacyjną, przy analizie i dyskusji wyników. Świadczy o tym także prawie 300 pozycji literaturowych zacytowanych w rozprawie. W rezultacie wyciągnął poprawne i ciekawe wnioski. Ponadto, chciałbym dodać, że Doktorant jest współautorem trzech publikacji, które ukazały się w bardzo dobrych czasopismach z zakresu biologii eksperymentalnej roślin: *Plant and Cell Physiology* (IF_{2018} = 3.929), *Journal of Experimental Botany* (IF_{2018} = 5.36) oraz *Plant Cell and Environment* (IF_{2018} = 5.624).

Szereg zawartych w recenzji uwag krytycznych ma charakter dyskusyjny i nie umniejsza wartości merytorycznej pracy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i w związku z tym zwracam się do Rady Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pana mgr. Piotra Zgłobickiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.