



Prof. UAM dr hab. Jarosław Gzyl

Poznań, dnia 26 października 2020 roku

Zakład Ekofizjologii Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6

61-614 Poznań

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Korbas pt. „Udział poliamin w reakcji ogórka (*Cucumis sativus* L.) na stres zasolenia”

1. Wprowadzenie

Praca doktorska Pani mgr Agaty Korbas dotyczy udziału poliamin w reakcji ogórka na stres zasolenia. Poliaminy (PA) jako niskocząsteczkowe organiczne kationy uczestniczą w wielu reakcjach fizjologicznych i procesach rozwojowych u bakterii, zwierząt i roślin. Co więcej, liczne doniesienia literaturowe wskazują na istotny udział PA w odpowiedzi roślin na różnego rodzaju stresy abiotyczne, w tym stres zasolenia. Obiektami tych badań są jednak najczęściej rośliny modelowe, rzadziej gatunki uprawne, stąd też nasza wiedza w odniesieniu do roślin uprawnych jest nadal fragmentaryczna, pomimo że niezwykle istotna. Poszczególne gatunki i grupy roślin mogą się bowiem różnić w szczegółach reakcji na stres, a to może mieć doniosłe znaczenie praktyczne np. w hodowli nowych odmian. Mało tego, ogórek jest rośliną klasyfikowaną jako wrażliwa na zasolenie, co dodatkowo wzmacnia zasadność podjęcia badań.

Celem recenzowanej pracy było wykazanie udziału PA w reakcji na stres zasolenia u ogórka gruntowego. Badania zostały podzielone na dwa etapy. W pierwszym etapie zbadano czy są różnice w reakcji 5 mieszańcowych odmian ogórka (Avatar F1, Huzar F1, Meteor F1, Poznański F1 oraz Śremski F1) na działanie NaCl w przedziale stężeń od 50 do 150 mM. Zakres badań na tym etapie obejmował analizę zmian względnej zawartości wody w liściach,

poziomu PA oraz aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych: peroksydazy gwajakolowej (GPX), peroksydazy askorbinianowej (APX), katalazy (CAT) oraz dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). W drugim etapie badań przeprowadzono rozszerzone badania dwóch odmian ogórka (Śremski F1 i Huzar F1) wybranych na podstawie zróżnicowanego poziomu utraty wody, a także różnic w poziomie akumulacji PA. Badania drugiego etapu obejmowały dodatkowo analizy poziomu reaktywnych form tlenu (anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru), zawartości świeżej i suchej masy korzeni oraz pędów, zawartości jonów sodu i chloru oraz obserwacje ultrastruktury komórek miękiszu asymilacyjnego. Dodatkowo w przypadku wariantów doświadczalnych drugiego etapu badań podjęto próbę modyfikacji poziomu PA przez zastosowanie dwóch stężeń (0.1 i 1 mM) egzogennej spermidyny (Spd) oraz jednego stężenia (0.1 mM) metylglioksal.bis-guanyl hydrazyny (MGBG) - inhibitora biosyntezy PA.

2. Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma układ typowy dla prac eksperymentalnych, liczy 169 stron i jest napisana w języku polskim. W jej skład wchodzi następujące rozdziały główne: Przegląd literatury, Cel i zakres pracy, Materiał i metody, Omówienie wyników, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie pracy zarówno w języku polskim jak i angielskim oraz Literatura. Dodatkowo na początku rozprawy zamieszczono Wykaz najważniejszych skrótów i symboli, a na końcu Wykaz tabel i rycin.

3. Uwagi redakcyjne

Praca napisana jest poprawnie, chociaż zdarzają się w tekście błędy stylistyczne, gramatyczne, literowe, interpunkcyjne i edytorskie. Występują też niestety niezręczności językowe bądź skróty myślowe, czy wręcz niezrozumiałe sformułowania, które nie powinny pojawiać się w tego typu opracowaniach. Podam kilka najbardziej jaskrawych przykładów: poliaminy „...wytwarzane endogenne przez inżynierię genetyczną” (str. 12); „Sól i stres spowodowany suszą to stresy abiotyczne” (str. 13); „Poliaminy mogą regulować rozmiar kanału K^+ i wielkość porów w błonie komórkowej komórek ochronnych, co silniej reguluje otwieranie i zamykanie się porów” (str. 13); „Akumulacja poliamin podczas stresu zasolenia różni się wrażliwością roślin na czynnik stresowy” (str. 13); „...a Cl^- płynie w błonie plazmatycznej i tonoplście komórek korzeniowych” (str. 17); „Jednym z głównych producentów transdukcji sygnału RFT są oksydazy NADPH...” (str. 17); „W celu złagodzenia uszkodzeń spowodowanych stresem oksydacyjnym rośliny nabyły środki do usuwania RFT...” (str. 19); „Halofity są definiowane jako rośliny, które w naturalny sposób

zasiedlają środowisko bogate w sól fizjologiczną i czerpią korzyści z posiadania znacznych ilości soli w roztworze glebowym (200 mM NaCl lub więcej)” (str. 22); „Kombinacje kontrolne roślin w pożywce, potraktowane roztworem Spd (0,1/1,0 mM) oraz roztworem MGBG (0,1 mM) były wysokie” (str. 77); „Podczas metabolizmu tlen może być aktywowany do reaktywnych formy tlenu (RFT), które mają silną zdolność oksydacyjną” (str. 138). Zdarzają się też przypadki błędów w danych bibliograficznych np. praca Flowers i wsp. została co prawda opublikowana online w grudniu 2014, ale ostatecznie została zamieszczona w numerze *Annals of Botany* z lutego 2015 roku. Dodatkowo w spisie literatury występują pozycje, które nie są cytowane w pracy tj. Khorolragchaa i Yang 2014 oraz Lisiecka i Pudelski 2001. Mają też miejsce przypadki braku konsekwencji w stosowaniu skrótów użytych w pracy np. w odniesieniu do reaktywnych form tlenu: raz używany jest skrót angielski ROS (str. 11), a już stronę dalej polski skrót RFT, albo przy omawianiu wyników względnej zawartości wody w liściach konsekwentnie stosowany jest skrót WZW, ale już w dyskusji używany jest anglojęzyczny skrót RWC (str. 132 i 136). Moje zastrzeżenia budzi też sposób graficznego opracowania wyników otrzymanych w drugiej części badań. Dotyczą one następujących kwestii:

1. Braku odstępu pomiędzy poszczególnymi wariantami czasowymi (tj. 6, 12 i 48h) oraz mały rozmiar czcionki stosowany w przypadku opisów poszczególnych wariantów doświadczalnych (np. ryciny dotyczące sumy wolnych poliamin - ryc. 4.66, 4.68, 4.70 i 4.72) co sprawia, że odbiór danych zawartych na wykresach jest utrudniony.
2. Oznaczenia legendy w przypadku ryc. 4.74-4.76 (str. 127 i 129) są konsekwentnie stosowane, jeżeli chodzi o kolory, tylko w odniesieniu do kombinacji kontrolnych. W przypadku wariantów stresowych stosowana jest już kolorystyka słupków nawiązująca do kolorów przypisanych poszczególnym wariantom doświadczalnym w Tabeli 3.3 na str. 31-32.

4. Ocena merytoryczna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska nie została oparta na jasno i konkretnie sformułowanej hipotezie roboczej, więc dostarcza jedynie opisu zmian na poziomie różnych parametrów fizjologicznych w roślinach ogórka poddanych stresowi zasolenia o różnej intensywności. Należy podkreślić znaczny nakład pracy Doktorantki oraz liczbę przeprowadzonych doświadczeń. Szkoda jednak, że badania nie zostały uzupełnione chociażby o analizy na poziomie genetycznym (np. sprawdzenie poziomu ekspresji kluczowych genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę PA) lub zweryfikowane przy użyciu alternatywnego podejścia eksperymentalnego (np. w przypadku aktywności

enzymów antyoksydacyjnych czy poziomu RFT), co uczyniłoby pracę bardziej kompletną i umożliwiło wyciągnięcie bardziej uzasadnionych wniosków. Uwagi dotyczące już ściśle rozprawy rozpoczną od oceny wstępu. Ta część pracy zawiera niestety jedynie najbardziej podstawowe informacje o poruszanych w badaniach zagadnieniach i np. w kontekście stresu zasolenia nie zostało nawet wprowadzone pojęcie „suszy fizjologicznej”. W tekście są odwołania do publikacji, prac przeglądowych i podręczników, niestety nie najbardziej aktualnych. Przykładem może być dość często cytowana praca przeglądowa Hussaina i wsp. z 2008 roku na temat stresu zasolenia – od tego czasu ukazało się już co najmniej kilka bardziej aktualnych prac przeglądowych. Dodatkowo, oprócz niezręcznych sformułowań o których wspomniałem w pkt. 3 niniejszej recenzji, pojawiają się informacje pod względem merytorycznym co najmniej kontrowersyjne np. na str. 22 Wstępu jest napisane: „Jon Na^+ wykorzystywane są do osmoregulacji polegającej na syntezie i akumulacji w obrębie wakuoli związków osmotycznie czynnych, takich jak: aminokwasy, aminy czwartorzędowe, wielowodorotlenowe alkohole cukrowe” – substancje kompatybilne, bo o nich mowa, są przede wszystkim akumulowane w cytoplazmie, gdzie chronią m.in. strukturę białek i błon przed nadmiarem jonów soli w komórce. Zasadnicza część moich uwag dotyczy jednak pozostałych części pracy. I tak, wymogiem eksperymentalnych prac naukowych jest podanie jasnego i pełnego opisu warunków hodowli oraz stosowanych metod, tak aby można było powtórzyć przeprowadzone badania i ocenić ich wiarygodność. W związku z tym mam następujące pytania i zastrzeżenia do części metodycznej pracy oraz otrzymanych w oparciu o opisane metody wyników i ich dyskusji:

1. Jakie były kryteria wyboru czasów działania i stężeń NaCl (6-72 h; 50-150 mM)? Czy oprócz względnej zawartości wody w liściach były brane pod uwagę inne parametry fizjologiczne lub morfologiczne świadczące o kondycji roślin ogórka w warunkach stresowych? W pracy nie zostały niestety zamieszczone zdjęcia roślin poddanych działaniu różnych stężeń NaCl. W związku z powyższym nasuwa się pytanie: czy były wykonane jakiegokolwiek badania wstępne i czy zastosowane stężenia soli indukowały stres o natężeniu łagodnym czy raczej umiarkowanym? Proszę Doktorantkę o uzasadnienie wyboru czasów działania i stężeń NaCl. Z kolei na podkreślenie zasługuje przygotowanie bardzo czytelnych rycin (3.3 i 3.4) obrazujących schemat pozyskania materiału roślinnego do I i II etapu badań.
2. Przy opisie poszczególnych metod brak jest jasnej informacji o rodzaju powtórzeń doświadczalnych. Dotyczy to m.in. oznaczeń względnej zawartości wody (WZW), oznaczeń poziomu anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru, oznaczeń zawartości świeżej i suchej masy oraz oznaczania przewodności elektrycznej pożywki.

Z kolei w opisie metod dotyczących oznaczania aktywności enzymów antyoksydacyjnych (GPX, APX, CAT i SOD) jest informacja o wykonaniu trzech osobnych powtórzeń laboratoryjnych – co to dokładnie oznacza? Proszę zatem o uściślenie o jakie powtórzenia chodzi: czy biologiczne (liczba próbek z niezależnych eksperymentów czy może liczba niezależnych próbek w ramach pojedynczego eksperymentu) czy techniczne (powtórzenia oznaczeń tej samej próby). Dodatkowo, dla wartości WZW zawartych w tabeli 4.1 na str. 46 nie podano odchyłeń standardowych – dlaczego, skoro w opisie metody (str. 33) jest informacja o wykonanych obliczeniach?

3. W drugim etapie badań zastosowano inhibitor syntezy poliamin (MGBG). Z danych przedstawionych na ryc. 4.67, 4.71 czy 4.73 wynika, że w przypadku kombinacji kontrolnych, na samym początku doświadczenia, nie ma istotnych statystycznie różnic w poziomie poliamin (a przynajmniej spermidyny) pomiędzy kontrolą bez inhibitora, a kontrolą z dodatkiem 0.1 mM MGBG. Nasuwa się pytanie: czy nie powinno się obserwować spadku poziomu poliamin? I czy w takim razie zastosowane stężenie MGBG było odpowiednio dobrane. Proszę Doktorantkę o odniesienie się do tej kwestii podczas obrony.
4. Czy procedura oznaczania przewodności elektrycznej pożywki (rozdział 3.2.11; str. 40) została oparta o konkretną metodę opisaną wcześniej w literaturze (brak cytowania w opisie) czy też jest autorską metodą Doktorantki? Czy wnioski dotyczące wpływu elektrolitów zawarte w punktach 7 i 8 (str. 147) rozdziału 6 (Podsumowanie i wnioski) zostały oparte o wyniki przewodności elektrycznej pożywki przedstawione na ryc. 4.74 (str. 127)? Jeżeli tak, to proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, na jakiej podstawie wnioskuje o poziomie wpływu elektrolitów? Jeżeli nie, to w którym miejscu pracy są opisane metody i wyniki uzasadniające wyciągnięcie takich wniosków.
5. Moje zastrzeżenia budzi jakość elektronogramów zamieszczonych w pracy (str. 131) oraz opis ultrastruktury przedstawionych na zdjęciach chloroplastów (str. 130). Dotyczą one następujących kwestii:
 - a) dlaczego w trakcie przygotowania skrawków do obserwacji w TEM zrezygnowano z ich kontrastowania przy użyciu octanu uranylu i cytrynianu ołowiu (str. 42). W rezultacie zdjęcia są mało kontrastowe i przy zastosowanym powiększeniu trudno dostrzec szczegóły ultrastruktury chloroplastów. Jakie było uzasadnienie takiej decyzji? Poza tym, elektronogramy reprezentujące próbki materiału pobrane z poszczególnych wariantów doświadczalnych przedstawiają chloroplasty w różnych

powiększeniach, co dodatkowo utrudnia przeprowadzenie analizy porównawczej. Standardem w tego rodzaju badaniach jest odpowiedni dobór powiększeń z informacją o wielkości powiększenia w postaci widocznego paska (lub skali) umieszczonego na elektronogramach, którego długość (lub odległość między działkami skali) odnosi się do konkretnej wartości liczbowej podanej najczęściej w μm lub nm . Czy zostały może wykonane zdjęcia spod większego powiększenia, tak aby można było lepiej zobaczyć szczegóły ultrastruktury chloroplastów? Jeżeli tak to proszę o ich pokazanie w trakcie obrony rozprawy.

b) czy w trakcie badań ultrastruktury komórek pobranych z liści poszczególnych wariantów doświadczalnych analizowane były te same fragmenty liścia? Przy opisie wyników pojawia się raz ogólne stwierdzenie „tkanka mezofilu” (str. 130), a dalej w tekście stwierdzenie, że „mięksisz gąbczasty wydawał się być bardziej dotknięty działaniem stresu zasolenia niż mięksisz palisadowy”. Nasuwa się zatem pytanie: komórki którego miękiszu są pokazane na elektronogramach? Czy Doktorantka dysponuje zdjęciami skrawków półcienkich barwionych błękitem toluidyny, o których mowa na str. 42 rozdziału Materiały i metody, pokazującymi ogólną strukturę miękiszu asymilacyjnego.

c) w opisie wyników analizy ultrastruktury komórek miękiszu na str. 130 można przeczytać, że „...liczba gran była znacznie zmniejszona. Plastoglobule zwiększały się pod względem liczby i wielkości w porównaniu z kontrolą”. Na przedstawionych elektronogramach trudno zauważyć te tendencje, tym bardziej, że na zdjęciach z poszczególnych wariantów doświadczalnych pokazano tylko od 1 do 3 (w zależności od powiększenia) chloroplastów komórek miękiszu asymilacyjnego. Nasuwa się pytanie: czy została przeprowadzona jakakolwiek forma analizy statystycznej uprawniająca do tego rodzaju wniosków?

d) w opisie wyników pojawią się dość niezręczne sformułowania dotyczące ultrastruktury chloroplastów np. „System membranowy złożony z dobrze zorganizowanych stosów tylakoidów połączonych za pomocą płytek zrębu” (str. 130). Szczególnie niefortunne jest określenie „płytki zrębu” będące prawdopodobnie przykładem kalki słownej z języka angielskiego; albo „struktura membran chloroplastowych stała się niekompletna” (str. 130) – poza niezręcznym sformułowaniem, nie wiadomo co oznacza to zdanie i na jakiej obserwacji się opiera.

6. Zastrzeżenia budzi mało precyzyjny opis wyników, który w mojej opinii nie zawsze odzwierciedla dane przedstawione na rycinach. Podam kilka przykładów z różnych części pracy. Na str. 50 Doktorantka napisała: „Najwyższą aktywność badanego

enzymu stwierdzono u odmiany Śremski F1 (6,14 nkat-72h) i Poznański F1 (6,72 nkat – 72h)” – jednak z ryciny 4.7 na str. 52 wynika, że najwyższą aktywność APX obserwowano w przypadku odmiany Meteor F1. Po 72h działania 100mM NaCl aktywność APX wynosiła ok. 10nkat i była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do odmian Śremski F1 i Poznański F1. Z kolei przy opisie poziomu akumulacji Spd na stężeniu 50mM NaCl (ryc. 4.18; str. 61) Doktorantka napisała „Najwyższą, wysoce istotną statystycznie akumulację tej poliaminy stwierdzono po 12 i 24h doświadczenia. Następnie synteza oznaczanej poliaminy spadała i nie były to różnice istotne statystycznie” (str. 59). Z ryc. 4.18 wynika raczej, że różnice były istotne statystycznie zarówno w stosunku do kontroli jaki i wariantów 12- i 24-godzinnych. Kolejny przykład można wskazać na str. 123, gdzie napisano „Zastosowanie u roślin przed wprowadzeniem stresu zasolenia wyższego stężenia Spd (1,0mM) wywołało niewiele niższą akumulację oznaczonych wolnych poliamin”, jednak z danych przedstawionych na ryc. 4.73 (str. 125) wynika, że nastąpił znaczący, istotny statystycznie, spadek poziomu akumulacji poliamin - w wariancie 6-godzinnym nawet o blisko połowę. Na koniec uwaga ogólna dotycząca opisu wyników. Doktorantka dość często opisuje wyniki doświadczeń tak jakby je prowadziła w reżymie ciągłym pisząc np. o spadku lub wzroście badanego parametru w kolejnych godzinach eksperymentu, a przecież wyniki przedstawione w pracy odnoszą się do konkretnych wariantów czasowych (w drugim etapie badań to 6, 12 i 48 h) i w takiej sytuacji nie ma podstaw do wnioskowania o zmianach zachodzących pomiędzy punktami czasowymi, w których pobierano próbki materiału do analiz.

7. Moje zastrzeżenia budzi również sposób przeprowadzenia dyskusji, która ma często powierzchowny charakter. Przykładem może być omówienie zmian aktywności APX obserwowanych u pięciu odmian ogórka testowanych w I etapie badań (str. 134), gdzie w zasadzie jest odniesienie do jednej publikacji (Doğan 2011), w której badania przeprowadzono na liściach soi, ale w zupełnie odmiennym układzie doświadczalnym, co podkreśla nawet sama Doktorantka. Z kolei w innej części dyskusji (str. 136) Doktorantka powołuje się na dane literaturowe wskazujące na wzrost aktywności oksydaz dwumianowej i poliaminowej, nie cytując przy tym żadnych źródeł literaturowych. Formulowane są też ogólne stwierdzenia, które nie do końca znajdują potwierdzenie w danych eksperymentalnych np. na str. 140 znajduje się stwierdzenie, że „Wyniki otrzymane w przedstawianej pracy potwierdzają powyższe poglądy stwierdzające, że poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest podwyższony przez PA”, a w rzeczywistości wyniki są mocno zróżnicowane i poziom aktywności

enzymów zależy od odmiany ogórka, czasu działania NaCl i zastosowanego stężenia egzogennej Spd.

8. Jeszcze większe zastrzeżenia budzą końcowe podsumowanie i wnioski (str. 146-148), w których zawarte konkluzje są bardzo ogólnikowe i wg mojej opinii w niektórych przypadkach nie do końca uprawnione. Przykładem może być wniosek 4 (str. 146): „Wyższe stężenie NaCl powoduje spadek aktywności SOD, APX, a niższe stężenie NaCl wzrost ich aktywności. Stres zasolenia miał niewielki wpływ na aktywność GPX, która utrzymywała się na niskim poziomie, niezależnie od stężenia NaCl i badanej odmiany ogórka”. Po pierwsze, nie końca wiadomo czy wniosek dotyczy wyników I czy II etapu badań - można się jedynie domyślać, że chodzi o wyniki drugiego etapu badań, w którym zastosowano tylko 2 stężenia NaCl (50 i 100 mM). Po drugie, generalne stwierdzenie o spadku aktywności SOD i APX na stężeniu 100 mM NaCl oraz wzroście aktywności tych enzymów na stężeniu 50 mM NaCl nie znajduje do końca potwierdzenia w danych przedstawionych np. na ryc. 4.42 i 4.43 (odmiana Śremski F1, str. 92 i 93). W przypadku wariantu 6-godzinnego aktywność APX kształtowała się akurat odwrotnie. Z kolei z ryc. 4.50 i 4.51 (odmiana Śremski F1, str. 102) wynika, że aktywność SOD w każdym wariantcie czasowym była wyższa od kontroli w przypadku zastosowania 100 mM NaCl, czego nie można powiedzieć o wariantach w których użyto niższego stężenia NaCl. Co więcej, w każdym z wariantów czasowych aktywność SOD była wyższa na stężeniu 100 mM w porównaniu ze stężeniem 50 mM NaCl. Po trzecie, aktywność GPX (ryc. 4.38-4.41) była wyraźnie istotnie statystycznie wyższa prawie we wszystkich wariantach czasowych zarówno w przypadku odmiany Śremski F1 jak i Huzar F1, więc trudno mówić o niewielkim wpływie obu stężeń NaCl na aktywność tego enzymu. Podobnym przykładem jest wniosek 10, w którym stwierdzono, że „Stosowanie egzogennej PA u roślin poddanych stresowi zasolenia stymulowało aktywność enzymów antyoksydacyjnych: SOD, CAT, APX, GPX w porównaniu z roślinami poddanymi tylko działaniu NaCl.”, jednak wyciągnięcie takiego wniosku w oparciu o dane z ryc. 4.38-4.53 znów nie do końca jest uprawnione, ponieważ aktywność wspomnianych enzymów była zróżnicowana i zależała od odmiany, czasu działania NaCl na rośliny oraz zastosowanego stężenia egzogennej Spd. Dlatego zalecałbym większą ostrożność w formułowaniu końcowych wniosków.

5. Podsumowanie

Podniesione przeze mnie niedociągnięcia i zastrzeżenia nie obniżają mojej raczej pozytywnej oceny pracy. Doktorantka wykonała bardzo wiele pracochłonnych i czasochłonnych analiz, które dostarczyły szerokiego zakresu danych eksperymentalnych, jednak otrzymane wyniki wymagają bardziej rygorystycznej interpretacji. Rozprawa dostarcza pewnych wniosków poznawczych dotyczących udziału poliamin w reakcji ogórka na stres, wymagają one jednak lepszego opracowania i dodatkowej walidacji. Zasadnicze uwagi dotyczące opisu metod, wyników oraz dyskusji i wyciągniętych na ich podstawie wniosków sformułowałem, aby skłonić Doktorantkę do przemyśleń odnośnie dalszych kierunków badań oraz sposobu publikowania wyników rozprawy. W konkluzji stwierdzam, że rozprawa spełnia minimalne wymagania stawiane pracom doktorskim i dlatego wnioskuję o dopuszczenie mgr Agaty Korbas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 26.10.2020



prof. UAM dr hab. Jarosław Gzyl