Kraków, 28 grudnia 2020

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
WYDZIAŁ BIOCHEMII,
BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Prof. dr hab. Halina Gabryś
Zakład Biotechnologii Roślin
Tel.: (12) 66 46 340
Fax: (12) 66 46 902
E-mail: halina.gabrys@uj.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr **Michała Szalonka**
p.t. „**Rola aneksyny 1 z ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) w adaptacji roślin do suszy**"

Uwagi ogólne

Praca Pana Szalonka powstała w Pracowni Patogenezy Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Promotorem pracy jest dr hab. Dorota Konopka-Postupolska, która od kilkunastu lat zajmuje się molekularnymi mechanizmami odpowiedzi komórek roślinnych na stres abiotyczny i funkcją w tych odpowiedziach aneksyn, rodziny białek z jednej strony zdolnych do wiązania wapnia, z drugiej – do wiązania ujemnie naładowanych fosfolipidów błonowych. Już pierwsze wyniki badań prowadzonych w Pracowni nad funkcjami aneksyn roślinnych wykazały, że ich aktywność może być elementem ogólnej strategii odpowiedzi na stres i warunkować tolerancję roślin na szkodliwe czynniki środowiskowe. Badania te prowadzono na modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana*. Autor recenzowanej rozprawy rozszerzył je na gatunek o dużym znaczeniu gospodarczym - *Solanum tuberosum*, ziemniak, co pozwoliło powiązać obserwacje mechanistyczne z aspektem praktycznym – plonowaniem w warunkach stresowych. W świetle powyższych uwag temat wybrany przez Doktoranta uważam za bardzo aktualny i ważny zarówno dla rozwoju wiedzy podstawowej jak i przyszłych zastosowań praktycznych. Znaczna część otrzymanych wyników została opublikowana w Plos One, w obszernym wieloautorskim artykule, którego Pan Szalonek jest pierwszym autorem.

Formalny opis rozprawy

Praca liczy 200 stron maszynopisu. Po bardzo szczegółowym spisie treści Autor zamieścił trzystronicowy wykaz stosowanych skrótów. W obszernym, 47-stronicowym wstępie można wyróżnić trzy części tematyczne. Pierwsza, najdłuższa poświęcona jest aneksynom roślinnym i zawiera ogólny opis nadrodziny, charakterystykę molekularną, informacje o lokalizacji, podrozdziały poświęcone ekspresji tych białek w roślinach z uwzględnieniem wpływu czynników wewnętrznych i środowiskowych, krótkie omówienie zaangażowania wybranych aneksyn na fizjologię roślin i dłuższe – właściwości biochemicznych aneksyn. Druga część wstępu traktuje o stresach abiotycznych i strategii roślin w walce z nimi: o suszy i stresie oksydacyjnym, ze szczególnym uwzględnieniem

działania mechanizmów ochrony aparatu fotosyntetycznego i tworzenia reaktywnych form tlenu. Najkrótszy, 3,5-stronicowy podrozdział omawia pochodzenie ziemniaka, znaczenie i zagrożenia jego uprawy.

Cel pracy został najpierw sformułowany w sposób ogólny, a następnie uszczegółowiony w postaci czterech zadań badawczych. 23 strony zajmuje część metodyczna zawierająca informacje na temat roślin, materiałów użytych do ich hodowli, transformacji i analizy oraz szczegółowy opis zastosowanych technik badawczych i warunków doświadczalnych. Najdłuższy (51 stron) jest rozdział zawierający opis i analizę uzyskanych wyników, podzielony na cztery podrozdziały, w których przedstawiono wyniki otrzymane w ramach kolejnych zadań badawczych. Wyniki te przedyskutował Autor w krótszym, 21-stronicowym rozdziale, uzupełnionym o podsumowanie wyników i wnioski. Imponujący spis cytowanej literatury liczy 503 pozycje (!).

Ocena merytoryczna

Autor postawił sobie za cel „zbadanie mechanizmu molekularnego i ochronnego wpływu aneksyn na przeżywalność oraz plonowanie ziemniaka w suszy". Z formalnego punktu widzenia sformułowanie to jest niezbyt precyzyjne ponieważ sugeruje zakres badań szerszy niż tytuł pracy i cele szczegółowe. Do celów szczegółowych zostały bowiem zaliczone: 1) identyfikacja w genomie ziemniaka genów kodujących aneksyny i wskazanie genu ulegającego najsilniejszej ekspresji w warunkach optymalnych i stresowych (a więc wybranie genu jednej aneksyny); 2) otrzymanie roślin transgenicznych z podwyższonym poziomem tej aneksyny i sprawdzenie, czy wykazują one lepszą tolerancję na suszę; 3) porównanie długotrwałego wpływu wytypowanej aneksyny na metabolizm roślin kontrolnych i nadekspresora w warunkach przejściowego deficytu wody, oraz 4) zbadanie wpływu nadekspresji tejże aneksyny na parametry użytkowe bulw ziemniaka. Nakreślone przez Autora (i nieco przeze mnie w powyższym ujęciu skondensowane) szczegółowe cele pracy zostały osiągnięte w stopniu w pełni satysfakcjonującym, przynosząc cały szereg interesujących i dobrze udokumentowanych wyników.

Przede wszystkim zidentyfikowano *in silico* dziewięć potencjalnych aneksyn z *S. tuberosum*, wyznaczono profil ich ekspresji w różnych organach ziemniaka, a następnie porównano ten profil dla liści, w warunkach suszy w stosunku do warunków komfortowych. Wykazano, że przy deficycie wody najsilniej spośród badanych transkryptów akumulowany jest mRNA aneksyny1. Podwyższony poziom ekspresji tego genu utrzymywał się również w okresie rehydratacji i regeneracji. Do dalszych badań wybrano zatem gen kodujący białko ANNST1, m.in. mając na uwadze cel nr 4, tj. ustalenie czy zwiększenie akumulacji endogennej aneksyny możne poprawić plony ziemniaka.

Eksperymenty te przyniosły bardzo pozytywne wyniki. Transgeniczne rośliny ziemniaka (ANNST1_OE) z ekotopową ekspresją ANNST1 znacznie lepiej tolerowały wywołany suszą niedobór wody w strefie korzeniowej, a ich zielone tkanki zachowywały większy turgor; w skali komórkowej, chloroplasty zachowywały swoje funkcje i wykazywały wyższą zawartość chlorofili niż rośliny typu dzikiego. Rośliny transgeniczne miały zwiększoną zawartość zeaksantyny i utrzymywała się ona w warunkach stresu. Jest to szczególnie istotne, ze względu na ochronną funkcję zeaksantyny dla aparatu fotosyntetycznego.

Ważnym osiągnięciem Autora jest wykazanie po raz pierwszy korelacji pomiędzy poziomem

aneksyny a wydajnością kwantową fotosystemu II. Wywołane przez niedobór wody zmniejszenie maksymalnej wydajności i szybkości transportu elektronów PSII, a także kwantowej wydajności fotosyntezy były mniej wyraźne w roślinach transgenicznych z nadekspresją aneksyny1 niż w roślinach typu dzikiego. Zapewniło to w warunkach suszy większą wydajność niefotochemicznego rozpraszania energii w zewnętrznych antenach PSII i - w konsekwencji - skuteczniejszą ochronę centrów reakcji fotosystemów przed uszkodzeniami fotooksydacyjnymi w roślinach transgenicznych. Dzięki temu, pomimo niedoboru wody, rośliny te efektywniej fotosyntetyzowały i dłużej rosły, co przełożyło się na większą produkcję bulw w porównaniu do roślin dzikiego typu.

Dążąc do wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększenie ochrony przed stresem Autor postawił hipotezę, że zwiększenie tolerancji na stres oksydacyjny w ziemniaku z podwyższonym poziomem aneksyny1 występuje dzięki utrzymaniu wyższego potencjału antyoksydacyjnego komórki. Zakonserwowane ewolucyjnie reszty cysteinowe obecne w aneksynach roślinnych mogą działać jako czynniki redukcyjne i w ten sposób regulować potencjał oksydoredukcyjny w komórce. Na podstawie serii doświadczeń przeprowadzonych na roślinach hodowanych w warunkach okresowego niedoboru wody bądź poddanych doświadczalnemu stresowi oksydacyjnemu (wywołanemu przez metylowiologen pod wpływem silnego światła) wykazano, że towarzyszący stresowi dehydratacji stres oksydacyjny jest kompensowany znacznie efektywniej w roślinach modyfikowanych. W roślinach tych procesy metaboliczne zostają zahamowane znacznie później niż w roślinach typu dzikiego.

Wyżej skomentowane wyniki są tym cenniejsze, że wskazują na możliwość skutecznego zabezpieczenia popularnej rośliny uprawnej - ziemniaka przed skutkami czasowego niedoboru wody, który jest jedną z najważniejszych przyczyn ograniczających produktywność współczesnego rolnictwa.

Autor przeprowadził także próbę lokalizacji komórkowej aneksyn, najpierw *in silico*, a następnie poddając ekspresji przejściowej w dyskach z liści tytoniu konstrukty zawierające sekwencje kodujące aneksyny, sfuzjowane z GFP. W większości przypadków aneksyny znajdowały się w cytoplazmie i w jądrze. W podobnym eksperymencie zanalizowano obrazy komórek poddanych stresowi oksydacyjnemu. Uzyskano kolejne dowody, że nadekspresja aneksyny1 chroni komórkę i chloroplasty przed stresem oksydacyjnym.

Na szczególne podkreślenie zasługuje wielostronność podejścia doświadczalnego. W pracy wykorzystano wiele różnorodnych metod, począwszy od bioinformatycznych (identyfikacja genów aneksyn, konstrukcja drzewa filogenetycznego), poprzez techniki biologii molekularnej (klonowanie sekwencji kodujących aneksyny, przygotowanie wektorów, analiza ekspresji genów), transformację bakterii i roślin (stałą *S.tuberosum* i przejściową *N.benthamiana*), regenerację roślin transgenicznych, po techniki biochemiczne i biofizyczne (oznaczanie poziomu białka, fitohormonów i barwników fotosyntetycznych, aldehydu malonowego, reaktywnych form tlenu, pomiar wymiany gazowej i fluorescencji chlorofilu *in vivo*).

Przedstawioną do recenzji pracę jako całość oceniam wysoko. Badania stanowią spójny ciąg logiczny, zostały dobrze zaplanowane i rzetelnie wykonane, wyniki przedstawiono w sposób jasny, opracowano statystycznie i zilustrowano czytelnymi rycinami i tabelami.

Problemy do dyskusji / uwagi krytyczne

Lektura rozdziału *Wyniki* nasunęła mi kilka pytań:

1) Analizując strukturę aneksyn ziemniaka Autor dochodzi do wniosku, że dwie z nich, ANNST4 i ANNST8 „przypuszczalnie całkowicie utraciły zdolność wiązania wapnia w wyniku licznych substytucji w obrębie motywu wiązania wapnia". Jednak działanie aneksyn wydaje się być wyraźnie związane z możliwością wiązania jonów wapniowych. Jak zatem Autor wyobraża sobie mechanizm działania tych dwóch białek i ich ewentualne funkcje?

2) Na Ryc. 17, przedstawiającej profil ekspresji genów aneksyn w wybranych organach ziemniaka zwraca uwagę wyraźnie wyższy poziom ekspresji *ANNST1* i *ANNST5* w bulwach. Jakie znaczenie może mieć ta podwyższona ekspresja w organach spichrzowych?
Opis zamieszczony w drugim akapicie rozdz. 4.1.4 nie odpowiada wynikom przedstawionym na tej rycinie: trudno zgodzić się z zaliczeniem genów *ANNST3.2* i *ANNST3.3* do grupy genów „których ekspresja zachodzi tylko w niektórych organach i to na bardzo niskim poziomie". Twierdzeniu temu przeczy podobieństwo przedstawionych na diagramie poziomów ekspresji obu wymienionych genów i genu *ANNST4*, który został zaliczony do grupy o wysokiej ekspresji we wszystkich organach. Jaki jest poziom genu referencyjnego w różnych organach?

3) Dlaczego na Ryc. 23. nie pokazano poziomów akumulacji mRNA dla *ANNST1* i *RAB18*, otrzymanych w czwartym dniu suszy (D4)? Ich brak powoduje trudności w zrozumieniu opisu zamieszczonego w podrozdziale 4.2.3 (str.101/ 102), w którym kilkakrotnie odniesiono się do tych wyników.

4) Zgodnie z wynikami przedstawionymi na Ryc. 25. fotosynteza netto wzrosła po rehydratacji znacznie słabiej w liniach transgenicznych niż w dzikim typie, podczas gdy przewodnictwo szparkowe wzrosło jednakowo, a nawet nieco lepiej dla linii OE7. Czy nie należałoby się spodziewać lepszej regeneracji fotosyntezy w liniach transgenicznych?

5) Podrozdział 4.3.2 muszę nazwać zabałaganionym. O ile pierwsza część tabeli 13 jest zrozumiała (z wyjątkiem oznaczenia pozycji „Całkowity CSI", którego nie potrafię rozszyfrować), o tyle nie rozumiem jakie informacje wnosi druga jej część, % sumy karotenoidów, zwłaszcza że wyliczone na chybił trafił sumy są różne i wynoszą np. 76 lub 81%.
Ponadto poziomy wiolaksantyny i zeaksantyny przedstawione, jako % sumy karotenoidów, w tabeli różnią się zasadniczo od poziomów przedstawionych na Ryc. 29. Proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności. Czy różnice pomiędzy poziomami ksantofili w dzikim typie i roślinach transgenicznych zostałyby utrzymane gdyby diagramy słupkowe wykonać używając danych z tabeli? W podtytule (i tabeli) ksantofile zostały połączone spójnikiem „i" z karotenoidami mimo, że ksantofile należą do karotenoidów.

6) Na Ryc. 30 (podrozdział 4.3.3) przedstawiono krzywe szybkości transportu elektronów w fotoukładach II i I (ETRI i ETRII) w funkcji natężenia oświetlenia. Nie mogę się zgodzić z Autorem, że krzywe te obrazują liniowy transport elektronów ponieważ pojęcie LTE odnosi się do transportu elektronów z cząsteczki wody do NADP, a więc do procesu obejmującego więcej składowych niż tylko fotoukłady. Kilkakrotnie pisze Autor także o wysyceniu świetlnym fotosyntezy odnosząc się do wysycenia krzywych transportu elektronów w obrębie PSII i PSI. Aby podać świetlny punkt

wysycenia fotosyntezy należałoby wyznaczyć krzywe świetlne fotosyntezy dla każdej linii w podanym dniu, a tego w pracy nie przedstawiono.
Konkludując, pisze Autor, że utrzymanie zbliżonych wartości ETRII w początkowym okresie suszy (do D9) w roślinach modyfikowanych świadczy o zachowaniu prawidłowej struktury i funkcji aparatu fotosyntetycznego. Jest to wniosek stanowczo za daleko idący: z wartości ETR można wnioskować o kondycji fotoukładów, nie zaś o funkcjonowaniu całego aparatu fotosyntetycznego.
Przy okazji: Natężenia światła nie mierzy się w mikromolach elektronów lecz w mikromolach kwantów. Paradoksalnie, pracy Kalaji i Łoboda 2010 zacytowanej w tym rozdziale w komentarzu technicznym brak w liczącym 503 pozycje spisie literatury.

7) W doświadczeniu nad wpływem suszy na ekspresję genów kodujących białka szoku cieplnego przedstawiono wyniki dla *HSP100* i *HSP40*. Interpretacja zamieszczona na końcu rozdziału wydaje się dotyczyć jedynie *HSP40* ponieważ z Ryc. 33 wynika, że akumulacja mRNA *HSP100* przebiega w warunkach suszy inaczej i jest podobna w liniach Sante i ANNST1_OE-7. Proszę Autora o komentarz na ten temat.

Pozostałe uwagi

Wstęp

- Stwierdzenie (str. 18) że „nie zawsze możliwa jest komplementacja delecji poszczególnych genów przez inne białka w obrębie rodziny" jest wyraźnym skrótem myślowym i powinno zostać doprecyzowane.
- *Uproszczony przebieg reakcji fotosyntezy* zamieszczony w rozdz. 1.7.2 został zdecydowanie uproszczony nadmiernie. Zgodnie z pierwszym zdaniem: „Światło jest pochłaniane przez cząsteczki chlorofilu umiejscowione w kompleksach antenowych (LHC), co powoduje uwolnienie elektronów" Jak to należy rozumieć? Skąd zostaje uwolniony $NADP^+$? Stwierdzenie, że błona tylakoidów oddziela dwa przedziały: lumen i stromę jest tylko częściowo słuszne bo nie dotyczy tylakoidów gran.

Metody

- Potencjał wody w glebie w punkcie 70% PPW wynosił zapewne 0,72 MPa (itd.) a nie 0,72 mPa.
- Opis pomiaru zawartości cukrów redukujących w bulwach nie zawiera istoty metody. Jak się ma barwa chipsów do tej zawartości?
- Czy według równania podanego na str. 77 oblicza się stężenia karotenów czy karotenoidów?

Wyniki

- W tekście pod Ryc. 25 znajduje się odniesienie do procedury pomiarowej opisanej w Rozdz. 3.2.14, ale w pracy nie ma takiego rozdziału.
- Ryc. 32. Krzywe wygaszania niefotochemicznego dla D0 i D21 nie różnią się zanadto kształtem - ich opisy sugerują natomiast obecność zasadniczych różnic.
- Ryc. 33. C i D – legenda niezgodna z opisem osi
- Str. 124. na dole: poziom mRNA PsbS dzikiego typu w dniach 14 i 21 nie wzrastał lecz malał w stosunku do D6

Dyskusja

- Sądzę, że do pierwszej tryplikacji genomu doszło nieco dawniej niż 140-150 lat temu…

- Str. 139: Jeśli aneksyny roślinne nie mają domen N-końcowych, czy należy rozumieć, że mają tylko domeny C-końcowe?

Ocena edytorskiej strony rozprawy

Praca ma przejrzysty układ i pozwala śledzić tok wywodu w sposób płynny i nie wymagający od czytelnika szczególnego wysiłku. Strona graficzna jest staranna, a materiał ilustracyjny dobrany właściwie i na ogół precyzyjnie opisany.

Tekst dysertacji pozostawia nieco do życzenia pod względem stylistycznym i gramatycznym, w kilku miejscach można znaleźć składnię i wyrażenia typowe dla języka angielskiego, jest także nieco za wiele tzw. literówek, zwłaszcza że czasem utrudniają one zrozumienie zdania. Liczba tych uchybień nie przekracza jednak aktualnej średniej spotykanej w polskich opracowaniach. Chciałabym jedynie polecić Autorowi zwrócenie uwagi na znaczenie trybu dokonanego i niedokonanego w opisach procedur doświadczalnych ponieważ recenzent lub osoba chcąca wykonać taka procedurę chcieliby zwykle wiedzieć czy jakąś czynność wykonano raz czy powtarzano kilka- lub wielokrotnie. Mieszanie trybów tego zadania nie ułatwia.

Podsumowanie

Powyższe uwagi krytyczne dotyczą głównie redakcyjnej strony przedstawionej mi do oceny rozprawy natomiast jej wartość merytoryczna nie budzi zastrzeżeń. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Macieja Szalonka jest cennym osiągnięciem Doktoranta, który przeprowadził, pionierskie badania i przedstawił szereg ważnych, oryginalnych wyników. Z jednej strony określiły one rodzinę aneksyn funkcjonujących w ważnej roślinie użytkowej – ziemniaku, z drugiej zaś rzuciły nowe światło na mechanizmy obrony roślin przed stresem abiotycznym, w szczególności – stresem suszy.

Logiczne zaplanowanie badań i systematyczne przeprowadzenie dowodów świadczy o tym, że Autor jest bardzo dobrze przygotowany do rozwiązywania problemów badawczych i prowadzenia rzetelnej analizy otrzymanych wyników. Szeroka i wielowątkowa dyskusja dowodzi dogłębnej znajomości tematyki i umiejętności krytycznej oceny wyników otrzymanych metodami *in silico*, technikami biologii molekularnej, biochemii i biofizyki.

W konkluzji stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie mgr Macieja Szalonka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Halina Gabryś