

Kraków, 16 listopada 2020

Prof. dr hab. Marcin Rapacz

Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Uniwersytet Rolniczy *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie

ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana Mgr Michała Szalonka „Rola aneksyny 1 z ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) w adaptacji roślin do suszy”

Rozprawa doktorska Pana Michała Szalonka obejmuje niezwykle ważne zagadnienie jakim jest tolerancja przez rośliny okresowego niedoboru wody w środowisku. Problem ten ma szczególne znaczenie w przypadku produkcji rolniczej w warunkach zmieniającego się klimatu prowadzącego w niektórych strefach klimatycznych, w tym w Polsce, do deficytu opadów. Poznanie mechanizmów dzięki którym rośliny będą w stanie tolerować okresy deficytu wody zachowując przy tym wysoką aktywność fotosyntetyczną oraz potencjał plonotwórczy ma kapitalne znaczenie dla utrzymania funkcji produkcyjnej użytków rolnych w warunkach zmieniającego się klimatu. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa w pełni wpisuje się w ten, jakże potrzebny i perspektywiczny nurt badań.

Napisana w języku polskim rozprawa liczy 200 stron i zawiera 39 rycin oraz 17 tabel.

Wyniki rozprawy doktorskiej opublikowano wcześniej w dużej części w pracy:

Szalonek M., Sierpien B., Rymaszewski W., Gieczewska K., Garstka M., Lichocka M., Sass L., Paul K., Vass I., Vankova R., Dobrev P., Szczesny P., Marczewski W., Krusiewicz D., Strzelczyk-Zyta D., Hennig J., Konopka-Postupolska D. (2015), Potato STANN1 promotes drought tolerance and mitigates light stress in transgenic *Solanum tuberosum* plants, „PLoS One”, 10(07).

Ze względów formalnych należy zauważyć, że rola doktoranta w przygotowaniu tej publikacji nie została określona stosownymi oświadczeniami współautorów. Należy też zauważyć, że praca ta została przedstawiona przez promotora niniejszej rozprawy (i jednocześnie autora korespondencyjnego tej publikacji) jako element osiągnięcia naukowego w toku postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego.

W stosunku do wzmiankowanej publikacji w rozprawie rozbudowano część wyników dotyczących molekularnej i bioinformatycznej analizy badanych aneksyn (są to np. informacje o pokrewieństwie filogenetycznym, czy analiza regionu DNA zawierającego gen ANNST2). Prezentowane w rozprawie wyniki zostały też rozszerzone o wyniki pomiarów ekspresji aneksyn w innych niż liście organach roślin, ich komórkową lokalizację, a przede wszystkim wyniki pomiarów aktywności fotosyntetycznej roślin i ekspresji genów kodujących inne, poza aneksynami białka (np. HSP, czy wybrane podjednostki fotosystemu II). Natomiast zarówno materiał badawczy jak i układ doświadczalny były nadal takie same.

Należy wyraźnie zaznaczyć, że:

- 1) Doktorant był pierwszym autorem wzmiankowanej publikacji.
- 2) W myśl ogólnie przyjętych praktyk włączanie prac naukowych będących wynikiem realizacji rozprawy doktorskiej do osiągnięcia naukowego ich opiekuna w postępowaniu habilitacyjnym jest powszechne i aprobowane, szczególnie w naukach eksperymentalnych.
- 3) Załączanie oświadczeń współautorów o charakterze udziału doktoranta w publikacji jest wymagane jedynie wtedy, gdy rozprawę doktorską stanowi publikacja/cykl publikacji, z czym nie mamy tutaj do czynienia.

W mojej opinii nie ma więc przesłanek wskazujących na brak samodzielności doktoranta w wykonaniu badań oraz interpretacji ich wyników.

Badania prezentowane w rozprawie znalazły wsparcie finansowe ze strony MNiSW (PBZ-MNiSW-2/3/2006/5), NCN (N 301 567540), EPPN (European Plant Phenotyping Network), która umożliwiła prowadzenie części badań w Biological Research Center of Hungarian Academy of Science, Szeged, Węgry oraz ze strony IBB PAN w ramach środków MNiSW przeznaczonych na finansowanie badań prowadzonych przez młodych pracowników nauki.

Celem pracy było zbadanie mechanizmu ochronnego wpływu aneksyn na przeżywalność oraz plonowanie ziemniaka w warunkach suszy.

Cel ten realizowany był poprzez: identyfikację genów aneksyn w genomie ziemniaka i określenie stopnia zmian ich ekspresji w warunkach suszy; modyfikację roślin w kierunku podwyższenia poziomu akumulacji aneksyny, której ekspresja była najsilniej aktywowana w suszy (ANNST1); wielostronną weryfikację fenotypu tej rośliny w warunkach kontrolnych i w warunkach suszy, określenie wpływu suszy na parametry użytkowe bulw roślin o podwyższonej ekspresji aneksyny oraz próbę odpowiedzi na pytanie o mechanizm obserwowanej zwiększonej tolerancji suszy.

We wstępie liczącym 47 stron, w tym 1 tabelę i 9 rycin doktorant scharakteryzował szczegółowo aneksyny biorąc pod uwagę ich genetykę, interakcję ekspresji z czynnikami

rozwojowymi i środowiskowymi, przebieg ekspresji, w tym modyfikacje potranslacyjne, czy ich wpływ na fizjologię roślin. Następnie przedstawiony został problem suszy, mechanizmy adaptacji roślin do warunków deficytu wody, mechanizmy percepcji deficytu wody, czy mechanizmy regulacji ekspresji genów w warunkach deficytu wody. W tym miejscu zabrakło może szerszego przedstawienia dotychczas podejmowanych prób podwyższenia tolerancji suszy zarówno metodami inżynierii genetycznej jak i metodami konwencjonalnej hodowli roślin ukierunkowanej na selekcję określonych cech fizjologicznych, czy obecności określonych genów. Szczególnie istotne byłoby tu przedstawienie sprzeczności istniejącej pomiędzy tolerancją suszy a zachowaniem wysokiego potencjału plonotwórczego u roślin rolniczych. W rozdziale tym scharakteryzowano też zjawisko stresu oksydacyjnego jako bezpośredniego skutku deficytu wody w roślinie oraz związek pomiędzy stresem oksydacyjnym a aktywnością fotosyntetyczną roślin. Tu znowu odczuwam pewien niedosyt ponieważ efekty suszy na funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego omówione zostały jedynie w aspekcie stresu oksydacyjnego, podczas gdy inne aspekty wiążące deficyt wody i proces fotosyntezy oraz akumulację biomasy/kształtowanie plonu nie zostały zaprezentowane, a aspekt ten mógłby być przydatny w późniejszej dyskusji uzyskanych wyników. We wstępie scharakteryzowano też biologię oraz znaczenie gospodarcze badanego gatunku rośliny. W tym miejscu wspomniano o kierunkach hodowli ziemniaka, ale ograniczono się jedynie do zastosowania metod inżynierii genetycznej i tolerancji suszy przy zachowaniu wysokiego potencjału plonotwórczego.

Materiały i metodyka. Materiałem badawczym w pracy były dwie linie ziemniaka nadekspresyjujące gen *ANNST1* oraz wyjściowa do ich wytworzenia odmiana Sante.

W pracy zaprezentowano metodykę identyfikacji genów aneksyn *in silico*, wskazania, które spośród tych genów ulegają najsilniejszym zmianom ekspresji podczas suszy – wyboru genu kandydującego do transformacji, otrzymania linii nadekspresyjnych oraz pomiarów charakteryzujących fenotyp badanych linii i linii wyjściowej (w tym ekspresję wybranych genów), w warunkach kontrolnych i w suszy.

W tym ostatnim zakresie wykonano pomiar względnej zawartości wody w liściu, pomiary zawartości wybranych regulatorów wzrostu, karotenoidów i chlorofili oraz pomiary fluorescencji chlorofilu i wymiany gazowej w liściach.

Wykonano też ocenę plonu bulw oraz ich jakości (zawartości skrobi i cukrów redukujących) po zakończeniu wegetacji.

W celu określenia możliwych konsekwencji nadekspresji *ANNST1* dla tolerancji stresu oksydacyjnego wykonano też doświadczenia mające na celu określenie reakcji badanych linii

na stres oksydacyjny wywołany promieniowaniem UV-b oraz stresem świetlnym po uwrażliwieniu krążków liściowych poprzez infiltrację herbicydu MV (parakwat, Methyl Viologen). W aspekcie stresu oksydacyjnego zbadano poziom MDA, O_2^- i H_2O_2 .

Wykonano też mikroskopowe obserwacje komórkowej lokalizacji aneksyn ziemniaka eksprymowanych w transformowanych liściach *N. benthamiana* po ekspozycji na czynniki stresowe (NaCl 150 mM; glicerol 20%; $CaCl_2$ 2mM; stres oksydacyjny indukowany przez MV) oraz ABA (100 μ M). Przyjęty poziom tych stresów nie jest w pracy uzasadniony. Poprosiłbym doktoranta o wyjaśnienie w tej sprawie.

W przypadku stresu oksydacyjnego pod mikroskopem badano też wpływ aneksyny na ochronę chloroplastów.

W części eksperymentalnej godny pochwały jest sposób prowadzenia doświadczeń suszowych zapewniający wysoką powtarzalność wyników oraz odpowiednie warunki kontrolne.

Należy stwierdzić, że zastosowane metody były adekwatne dla rozwiązania postawionego problemu badawczego a ich opis jest na ogół precyzyjny i wystarczający.

Nie do końca zrozumiały, czy może nie do końca adekwatny jest opis przyjętej metodyki pomiaru wygaszania niefotochemicznego energii promieniowania fotosyntetycznie-czynnego absorbowanej przez liść (NPQ) lub też doktorant nieprecyzyjnie ją wyjaśnił. W powszechnym pojęciu (np. Buschmann 1999, *Photosynthetica* 37, 217-34 lub Muller et al. 2001, *Plant Physiology* 125, 1558-1566) pomiary wygaszania niefotochemicznego oraz jego komponentów wykonywane są na liściach zaadaptowanych do światła o określonym natężeniu. Tymczasem doktorant opisuje (rozdział Wyniki) sposób wykonywania pomiarów tak, jakby liście adaptowane były do ciemności w celu określenia NPQ. Następnie przez okres 5 minut liście adaptowane są do niskiego natężenia światła ($94 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) co jak widać z przebiegu wykresu i co wiem z własnego doświadczenia jest czasem na granicy pełnej adaptacji, która jak wynika z ryc. 31 nastąpiła tylko u typu dzikiego. Następnie światło było wyłączane i wykonywano ponowne pomiary NPQ, przy czym okres ponownej adaptacji wynosi 240 s (jeśli chodziłoby o pomiary komponentów NPQ to czas ten powinien wynosić przynajmniej 1200 s). Na przedstawiającej wyniki tych pomiarów rycinie 31 oś Y opisana jest jako kinetyka NPQ (jednostki arbitralne). Zakres tej skali kończy się na 1 co sugeruje raczej jakieś jednostki względne.

Wyniki prowadzonych badań zaprezentowano i opisano w sposób systematyczny i czytelny. Prezentacja wyników objęła 27 rycin i 2 tabele. W analizie wyników zastosowano adekwatne metody statystyczne a ich wyniki poprawnie zinterpretowano.

W rozprawie najcenniejszą z punktu widzenia praktycznego informacją jest to, że u ziemniaka możliwe jest podwyższenie potencjału plonu bulw w warunkach suszy będące efektem nadekspresji własnego genu. W pracy co prawda uzyskano ten efekt budzącymi opory konsumenckie metodami inżynierii genetycznej, lecz pozytywny efekt cis-genezy daje nadzieje na uzyskanie podobnego efektu na drodze selekcji.

Do najistotniejszych szczegółowych wyników pracy zaliczyć można obserwację, że zwiększeniu tolerancji stresu suszy w roślinach ziemniaka z podwyższoną akumulacją ANNST1 towarzyszyło zachowanie sprawności aparatu fotosyntetycznego, w tym niezmięszone przewodnictwo szparkowe oraz zwiększona tolerancja na stres świetlny zapewniająca ochronę aparatu fotosyntetycznego w warunkach ograniczonej karboksylacji. Wynik ten jest na tyle istotny, że daje on nadzieję, że modyfikacje genetyczne lub nawet klasyczne prace hodowlane zmierzające do zwiększonej akumulacji aneksyn mogą przyczynić się do wytworzenia nowych odmian roślin ziemniaka o zwiększonej tolerancji suszy.

Interesującą obserwacją, wskazującą na hipotetyczny mechanizm wpływu nadekspresji aneksyny na zachowanie sprawności aparatu fotosyntetycznego w warunkach suszy jest to, że w roślinach modyfikowanych obserwowano wydajniejszą neutralizację reaktywnych form tlenu (RFT) powstałych w wyniku zaburzenia równowagi oksydoredukcyjnej w warunkach deficytu wody. Natomiast utrzymanie zdolności do wydajnego prowadzenia procesu fotosyntezy w czasie stresu, a także szybsza regeneracja aparatu fotosyntetycznego po ustąpieniu suszy, która również mogła być związana ze sprawniejszym usuwaniem RFT, miała zapewne znaczący wpływ na akumulację biomasy oraz formowanie się i wzrost bulw.

Dyskusja pracy jest niezwykle obszerna i stanowi kompleksowy opis wiedzy dotyczącej genomiki, struktury i funkcji aneksyn roślinnych w oparciu o dane literaturowe uzupełnione o wyniki doktoranta zamieszczone w rozprawie.

Należy przy tym zaznaczyć, że nie jest to typowy sposób prowadzenia dyskusji w rozprawie doktorskiej, w którym własne wyniki analizowane są na tle obecnego stanu wiedzy. Stwierdzenie to nie ma jednak charakteru wartościującego i nie zaprzecza kompetencji doktoranta w krytycznym podejściu do uzyskanych wyników. Wręcz przeciwnie dowodzi dobrej znajomości opisywanych zagadnień. Jediną negatywną uwagą dotyczącą tej części pracy jest to, że część wyników badań, szczególnie tych, gdzie nie obserwowano wyraźnego wpływu nadekspresji aneksyny, nie zostało przedyskutowanych w sposób wyczerpujący.

W pracy nie sformułowano wniosków. Zamieszczono za to podsumowanie uzyskanych wyników. Stwierdzenia zamieszczone w dwóch pierwszych akapitach tego

rozdziału uznać można za poprawnie wyciągnięte wnioski.

Dalsza część podsumowania zawiera opis interakcji wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w procesy neutralizacji reaktywnych form tlenu.

W pracy cytowanych jest ponad 500 pozycji literatury. Jest to ilość bardzo duża co wynika z bardzo detalicznego opisu stanu wiedzy zamieszczonego przez doktoranta zarówno we wstępie jak i w dyskusji.

Strona redakcyjna pracy zasługuje na pozytywną ocenę. Układ tekstu, ryciny oraz tabele są przejrzyste i czytelne. Używany język jest poprawnym językiem naukowym, przy czym doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów, czy skrótów myślowych. Dla przykładu:

W definiowaniu celu pracy pisze on o identyfikacji pełnego zestawu aneksyn w genomie. „Pełny zestaw” jest określeniem żargonowym, natomiast białek (aneksyn) w genomie zidentyfikować się nie da w przeciwieństwie do kodujących je genów.

Przyjęta przez doktorantka jednostka gęstości strumienia kwantów w zakresie PAR (np. podpis ryc. 31) to $\mu\text{mol e}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, gdzie nie wyjaśniono co w tej jednostce oznacza „e”.

Na stronie 74 wspomniano, że do doświetlania roślin użyto lamp sodowych. Ponieważ nie podano jakich nie wiadomo, czy źródło to było odpowiednie (np. niskoprężne lampy sodowe ze względu na swoje prawie monochromatyczne światło nie nadają się do tego celu).

Językowo niepoprawny jest zwrot tolerancja na suszę/stres. Poprawne jest określenie tolerancja suszy/stresu. Z drugiej strony w warstwie terminologicznej na zdecydowaną pochwałę zasługuje używanie przez doktoranta pojęcia tolerancja suszy, gdyż w większości opracowań polskojęzycznych używa się niepoprawnego w przypadku roślin homeohydrycznych pojęcia odporności na suszę (lub nawet odporności na dehydratację).

Podsumowanie i wniosek końcowy:

Stawiane w recenzji zarzuty dotyczą głównie problemów (braków, nieścisłości) nie rzutujących na merytoryczną wartość uzyskanych wyników, czy poprawność ich interpretacji. Sama rozprawa wnosi wartościowy wkład w wiedzę dotyczącą mechanizmów tolerancji stresu suszy u roślin u których pożądane jest zachowanie w tych warunkach potencjału produkcji biomasy. Praca zawiera hipotezę dotyczącą mechanizmu działania aneksyn poprzez zwiększenie wydajności systemu antyoksydacyjnego chroniącego aparat fotosyntetyczny w warunkach suszy. Hipoteza ta znajduje potwierdzenie w uzyskanych wynikach. W związku z tym uważam, że **rozprawa Pana mgr inż. Michała Szalonka stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań**, co jest ustawowym wymogiem stawianym rozprawom doktorskim.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona kryteria stawiane w Artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pana mgr Michała Szalonka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Marcin Rapacz