



INSTYTUT DENDROLOGII

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

62-035 KÓRNIK, ul. Parkowa 5
e-mail: idkornik@man.poznan.pl

tel. 61 817 00 33, fax 61 817 01 66
www.idpan.poznan.pl

dr hab. Tomasz Pawłowski, prof. nadzw.

Kórnik, 13.07.2018

Pracownia Biologii Rozmnażania i Genetyki Populacyjnej

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Paluch-Lubawej pt. „Identyfikacja izoform akwaporyn błony komórkowej kukurydzy związanych z mikoryzą arbuskularną oraz ich udziału w symbiotycznej tolerancji na niedobór wody”, wykonanej pod kierunkiem prof. UAM dr. hab. Władysława Polcyna w Zakładzie Fizjologii Roślin Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Eweliny Paluch-Lubawej była analiza profilu akumulacji akwaporyn błony komórkowej oraz jego kontekstu transkrypcyjnego u roślin poddanych progresywnie rozwijającej się suszy, a następnie rehydratacji. Badania te były prowadzone w odniesieniu do wybranych parametrów homeostazy roślinnej, a także w oparciu o ocenę żywotności partnera grzybowego. Badania przeprowadzono na układzie hodowlanym grzyba *Rhizophagus irregularis* i kukurydzy. Porównano rośliny mikoryzowane i nie mikoryzowane pod względem efektywności symbiotycznej oraz nawadniającej funkcji mikoryzy. Eksperymenty przeprowadzone w pracy doktorskiej rzucają nowe światło na rolę inokulacji roślin grzybami endomikoryzowymi w celu poprawy odporności roślin na stres suszy i zapewnienie stabilności plonów w zmieniających się warunkach pogodowych. Wykonane badania w znaczącym stopniu wpłynęły na poszerzenie wiedzy o mechanizmach regulujących tolerancję na suszę wywołaną układem symbiotycznym roślina - grzyb. Z tych względów tematykę rozprawy mgr Eweliny Paluch-Lubawej uważam za bardzo aktualną i nadzwyczaj ważną naukowo.

Strona formalna rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń. Skonstruowana została w sposób tradycyjny, składa się z 10 podstawowych części: Wstępu, Celów Pracy, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Podsumowania, Streszczenia, Summary, Załączników i Literatury. Rozprawa liczy 169 stron, zawiera 43 rysunki i 15 tabel. Praca napisana jest starannie, jasno i zwięźle z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami. Dostrzegłem w niej stosunkowo niewielką liczbę błędów stylistycznych i edytorskich. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy zaawansowanych metod fizjologii roślin, biologii molekularnej, narzędzi bioinformatycznych oraz metod statystycznych. Dane przedstawione zostały w sposób czytelny dla szerokiego grona czytelników.

We Wstępie Doktorantka opisała szeroko zagadnienia związane z uprawą kukurydzy w Polsce, problemami związanymi z pogłębiającą się suszą, mechanizmami odpornościowymi na jej działanie, oraz ewentualnym wprowadzeniem do praktyki rolniczej inokulacji roślin grzybami mikoryzowymi. Opisała szczegółowo osiągnięcia dotyczące badań białek transportujących wodę, akwaporyn, w tym ich roli w aklimatyzacji do stresów abiotycznych. Doktorantka omówiła następnie zagadnienia związane z mikoryzami arbuskularnymi i ich rolą w związku mutualistycznym z roślinami, w tym regulacji aktywności akwaporyn. Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w szeroki zakres badań fizjologicznych nad stresem abiotycznym, i jednocześnie stanowi rozwinięcie prowadzonych wcześniej prac badawczych. W opinii recenzenta ta część pracy napisana jest zwięźle i wyczerpująco, z wykorzystaniem wielu współczesnych publikacji naukowych, wprowadzając w zagadnienia obejmujące temat pracy, stanowiąc podstawę do podjęcia opisywanych badań.

Na podstawie tych danych mgr Ewelina Paluch-Lubawa sformułowała Cele Pracy. Głównym celem pracy było poznanie symptomów tolerancji kukurydzy zależnych od interakcji mikoryzowej oraz ich korelacji z regulacją akwaporyn tkanek liściowych i korzeniowych. Poszczególne cele szczegółowe pracy zostały opisane jasno i zwięźle, w sposób czytelny i logiczny wprowadzając do przeprowadzonych eksperymentów. Jednocześnie wyczerpują one całą gamę zagadnień, które planowało się wykonać aby cele podstawowe pracy zostały osiągnięte.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób ciekawy i obszerny, co umożliwia ich łatwą analizę i wyciąganie wniosków. Z drugiej strony analiza porównawcza dużej ilości danych

stanowiła wyzwanie pod względem organizacyjnym i analitycznym. Z tego zadania Doktorantka wywiązała się jednak bardzo dobrze, podsumowując wyniki po każdym etapie badań, oraz w Dyskusji i na rysunkach podsumowujących wyniki badań.

Na podkreślenie zasługuje opracowanie przez Doktorantkę optymalnych warunków nawożenia w celu zachowania wysokiej żywotności grzybni wewnątrzkorzeniowej. Dzięki temu udało się uniknąć wpływu poziomu odżywiania roślin na różnice fizjologiczne i molekularne w czasie stresu u roślin mikoryzowanych i nie mikoryzowanych. Porównanie roślin mikoryzowanych i nie mikoryzowanych o podobnym statusie odżywiania stworzyło podstawy do oceny efektywności symbiotycznej zależnej od nawadniającej funkcji mikoryzy.

Opierając się na ww. wynikach Doktorantka skupiła się w dalszej części pracy na zbadaniu wpływu mikoryzy na profil akumulacji akwaporyn korzeni i liści podczas szybko zmieniających się warunków nawodnienia techniką immunodetekcji. Dodatkowo zweryfikowała techniką MS identyfikację białek. Porównując akumulację akwaporyn w korzeniach i liściach mikoryza utrzymywała wysoki poziom akwaporyn w okresie suszy i na początku dehydratacji, co sugeruje zwiększoną gotowość do przewodzenia wody na ścieżce transbłonowej. Obserwacja ta korelowała z większą dynamiką wymiany gazowej liści roślin mikoryzowanych.

Plusem wykonanych doświadczeń jest też wytłumaczenie pojawiania się dodatkowego prążka dla izoformy PIP2 (efekt zmiennej zdolności wiązania SDS do hydrofobowych domen monomerów), co też pokazuje jakie trudności można spotkać w trakcie przeprowadzania eksperymentów. Doktorantka przyjęła tutaj bardzo pozytywną postawę znalezienia przyczyn zaobserwowanych, ale nieoczekiwanych, trudności.

Przy normalizacji wyników z pomiarów densytometrycznych poziom akumulacji akwaporyn w liściach odnoszono do ścieżki S7 NM, a dla korzeni do S0 NM. Dlaczego tak wybrano? Proszę to wyjaśnić. Również jeśli chodzi Rys. 20, nie wiadomo czym się różni rys. A od C i B od D? Brak jest opisu.

Doktorantka dokonała też analizy funkcjonalnej spektrum heterokompleksów akwaporyn posługując się technikami wykorzystywanymi w proteomice. Zaobserwowała przeciwny wzór akumulacji PIP2 w korzeniach i liściach w odpowiedzi na niedobór wody,

niezależnie od stanu symbiotycznego. U roślin mikorhizowych zachodzi

w przypadku liścia przykolbowego wykazała wyraźny spadek ekspresji akwaporyn w czasie suszy dla roślin nie mikoryzowanych oraz stabilny dla roślin mikoryzowanych. Doktorantka zasugerowała, że sprawniejsza w tym przypadku aklimatyzacja do suszy wynika z wyższego poziomu ekspresji akwaporyn.

Doktorantka zaobserwowała dla liści wierzchołkowych wysoki poziom SA u roślin mikoryzowanych w czasie suszy, co, sugeruje, może interferować z zatrzymaniem procesu endocytozy akwaporyn z błony komórkowej i tłumaczyć korelację suszy z ich akumulacją. Profil akumulacji ABA różnił się pomiędzy roślinami w zależności od pietra liściowego. Mikoryza natomiast miała wpływ na poziom ABA (spadek) jedynie w liściu przykolbowym.

Dyskutując otrzymane wyniki i dane literaturowe mgr Ewelina Paluch-Lubawa szeroko omówiła, porównała i podsumowała obecny stan wiedzy na temat wpływu mikoryz na tolerancję roślin na stres suszy. Dyskusję wzbogaciła Rys. 40, który w sposób całościowy prezentuje model podsumowujący regulację aktywności parametrów fizjologicznych roślin spowodowaną udziałem grzybów mikoryzowych. Korzyści symbiotyczne obserwowała jako przyspieszenie dynamiki rehydratacji i odwrócenia procesów starzeniowych. Podsumowała, że głównie w okresie rehydratacji zaznaczał się efekt kompensacyjny, zwiększający tolerancję roślin mikoryzowanych na stres. Wysnuła też hipotezę o związku przyczynowym pomiędzy intensywnością transbłonowego transportu wody a konduktancją szparkową na podstawie obserwacji wzrostu akumulacji akwaporyn i poprawy parametrów wymiany gazowej liści u roślin mikoryzowanych. Uznała to za wyjaśnienie poprawy tolerancji na stres u roślin mikoryzowanych. Dodatkowo zauważyła, że akwaporyny pojawiają się w komórkach zawierających symbionta grzybowego. Co wydaje się logiczne ze względu na funkcję pełnioną przez grzyba. Wnioskuje też, że wzór akumulacji akwaporyn może być wskaźnikiem tolerancji na stres wodny wspomagany mikoryzą.

Badając tkankowo-specyficzną kompozycję heterooligomerów PIP i wzór ich akumulacji jako element odpowiedzi na zmianę warunków nawodnienia Doktorantka zauważyła, że akwaporyny PIP1 w mniejszym stopniu pełnią funkcję przewodzenia wody w korzeniach, natomiast regulacja przewodzenia wody ścieżką transbłonową opiera się głównie o oligomery skomponowane z izoform typu PIP2. W liściach natomiast największy udział w reakcjach na suszę przypisała oligomerom zawierającym równoważną proporcję izoform typu

PIP1 w stosunku do PIP2. Ten sposób regulacji można traktować jako adaptację polegającą na zwiększeniu przewodzenia transbłonowego w liściach, tym samym utrzymaniu siły ssącej transpiracji. Wnioskuje, że jednym z mechanizmów podnoszących tolerancję na stres u roślin mikoryzowanych jest zwiększony udział izoform typu PIP1 w liściach, regulowany w sprzężeniu zwrotnym z konduktancją aparatów szparkowych. Podsumowała te wyniki na Rys. 43.

Doktorantka stwierdziła też wyższą wartość indeksu chlorofilu do flawonoidów (NBI) roślin mikoryzowanych w czasie suszy i rehydratacji, co wskazuje na zwiększenie wydajności pionowej dystrybucji azotu dzięki aktywności mikoryzy. Równocześnie rośliny mikoryzowane wykazywały się mniejszymi uszkodzeniami błon komórkowych, co świadczy o ochronnej funkcji mikoryz. Na uwagę zasługuje też opisanie wpływu mikoryzacji na wzrost poziomu SA, co może mieć wpływ na zwiększony poziom akwaporyn w czasie suszy. **Czym można natomiast wytłumaczyć niską zawartość ABA u roślin mikoryzowanych?** Podsumowując tą część pracy Doktorantka stwierdziła, że była korelacja pomiędzy wybranymi piętami liści i profilem ABA, SA i parametrów wymiany gazowej i ekspresji akwaporyn, które wydają się być elementami utrzymania homeostazy w warunkach suszy.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca stanowi istotny wkład w poznanie mechanizmu tolerancji roślin na suszę poprzez usprawnienie transportu wody dzięki symbiozie z grzybami mikoryzowymi. Uważam, że w trakcie prac doświadczalnych i podczas przygotowywania rozprawy doktorantka wykazała się umiejętnością formułowania i rozwiązywania problemów naukowych. Wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Wydziału Biologii UAM w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Paluch-Lubawej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Paluch-Lubawej w związku z ponad przeciętnym poziomem naukowym przeprowadzonych badań i przygotowanej rozprawy.



Tomasz Pawłowski