

Łódź, dn 8 VI 2015 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

pt. „Molecular and physiological basis of rape (*Brassica napus* L.) seeds osmopriming”

wykonanej przez uczestnika Studiów Doktoranckich Wydziału Biologii UAM mgr **Szymona Kubalę**
pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Garnczarskiej, prof. nadzw. UAM
w Zakładzie Fizjologii Roślin, Instytutu Biologii Eksperymentalnej,
Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu

1. Uwagi ogólne

Nasiona są jedną z głównych form plonu rolniczego, ponieważ gromadzą substancje będące podstawą żywienia, ale również stanowią materiał wyjściowy do kontynuacji hodowli następnych pokoleń roślin. Są to główne przyczyny, dla których prowadzi się badania: (i) nad opracowaniem wydajnych metod produkcji nasion wysokiej jakości, (ii) przedsięwzięcia przygotowania ich do szybkiego, równomiernego i wydajnego kiełkowania oraz (iii) optymalizacji warunków dla najlepszego wzrostu młodych siewek. **Oceniana dysertacja doktorska wpisuje się w nurt drugiego z przytoczonych tu kierunków badań - jest związana z opracowaniem i monitorowaniem efektów przedsięwzięcia osmokondycjonowania nasion rzepaku (*Brassica napus* L.).**

Kondycjonowanie nasion - różne techniki - są od lat szeroko stosowane jako skuteczna metoda uszlachetniania materiałów siewnych. Odpowiednio dobrane i zastosowane - zarówno etap kontrolowanego uwadniania jak i wtórna desykacja, czasem dodatkowo uzupełnione aplikacją substancji biologicznie czynnych - polepszają wigor nasion, podwyższają ich zdolność kiełkowania, a także sprzyjają podniesieniu tolerancji na stresy. Mechanizmy, które wywołują wymienione pozytywne efekty w nasionach, do tej pory eksplorowane były najczęściej na poziomie fizjologicznym i biochemicznym, natomiast celem nadrzędnym i niewątpliwym atutem niniejszej pracy jest fakt przedstawienia i dyskusowania molekularnych zmian w osmokondycjonowanych nasionach rzepaku.

Biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że **podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia**

2. Uwagi formalne

Przedłożona do recenzji praca doktorska ma formę zbioru trzech wielo-autorskich publikacji stanowiących logiczną całość, w których udział Doktoranta jako pierwszego autora jest zdecydowany i wiodący:

Kubala S. (pierwszy autor, 55%), Garnczarska M., Wojtyła Ł., Clippe A., Kosmala A., Żmienko A., Luttus S., Quinet M.: Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach. *Plant Science* 2015, **231**: 94-113.

Kubala S. (pierwszy autor, 60%), Wojtyła Ł., Quinet M., Lechowska K., Luttus S., Garnczarska M.: Enhanced expression of proline synthesis gene *P5CSA* in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. *Journal of Plant Physiology* 2015, doi:10.1016/j.jplph.2015.04.009 (w druku - dostępna w internecie).

Kubala S. (pierwszy autor, 50%), Wojtyła Ł., Garnczarska M.: Fizjologiczne i biochemiczne podstawy kondycjonowania nasion. *Postępy Biologii Komórki* 2013, **2**: 199-214.

Dysertacja opatrzona jest tytułem i streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, dwa z prezentowanych artykułów wydane zostały w języku konferencyjnym - co czyni ich oryginalną tematykę dostępną dla międzynarodowej rzeszy czytelników; ostatni, przeglądowy - w języku polskim. Poza zasadniczą treścią publikacji opatrzonych bogatym materiałem uzupełniającym w wersji drukowanej i elektronicznej, dysertacja zawiera: podziękowania, dane o źródłach finansowania eksperymentów, spis treści, szczegółowe informacje o udziałach i funkcjach wszystkich współautorów w tworzeniu poszczególnych publikacji, poparte stosownymi oświadczeniami wszystkich zainteresowanych osób, a także aneks z informacją o dorobku naukowymi i wyróżnieniach Doktoranta.

Przyjęta i zaprezentowana **forma dysertacji spełnia wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim w myśl Ustawy** z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.).

3. Uwagi szczegółowe

Najwcześniejszy z przedłożonych artykułów: **„Fizjologiczne i biochemiczne podstawy kondycjonowania nasion”** - to niejako teoretyczny wstęp do dysertacji. Stanowi przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat fizjologicznych i biochemicznych podstaw kondycjonowania nasion. Wskazuje na: zmiany konformacyjne błon, uruchamiane procesy naprawcze, katabolizm inhibitorów kiełkowania, mobilizację rezerw oraz zmiany w aktywności niektórych enzymów w nią zaangażowanych, jak również enzymów utrzymujących odpowiedni status *red-ox*, a także regulację cyklu komórkowego i metabolizm kwasów nukleinowych - które to procesy ulegają modyfikacjom w skutek zastosowania odpowiednio dobranych technik przedsewnego kondycjonowania nasion. Praca ta jest dobrym materiałem źródłowym, szczególnie cennym dla studentów,

gdyż opracowanym w języku polskim. Na naszym rynku wydawniczym brak jest aktualnej monografii traktującej o fizjologii nasion - procesach tworzenia się, dojrzewania, desykacji, dormancji i kiełkowaniu różnych typów nasion oraz metodach ich kondycjonowania. Tym bardziej ww. publikacja jest cenna, powinna spotkać się z zainteresowaniem i daje nadzieję na cytowania.

Kolejne dwie prace to oryginalne prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach o znacznym współczynniku oddziaływania - IF 4,114 oraz 2,770 odpowiednio dla *Plant Sci*, i *J. Plant Physiol*.

W pracy pt. „**Deciphering priming-induced improvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) germination through an integrated transcriptomic and proteomic approach**” - po przedstawieniu pozytywnego wpływu wybranej metody - osmoprimingu, na kiełkowanie nasion rzepaku w warunkach optymalnych, analizowano zmiany na poziomie transkryptów i biosyntezy białek w ww. nasionach podczas samego zabiegu kondycjonowania z rozgraniczeniem na fazy kontrolowanego uwadniania i następnie desykacji, a także podczas pierwszych 7 godzin kiełkowania *sensu stricto*, w porównaniu do nasion kontronych - przedsięwzię nie traktowanych. Praca stanowi kompendium wiedzy o zmianach na poziomie molekularnym, które zachodzą podczas obu kluczowych etapów osmokondycjonowania. Nie od dziś wiadomo, że tylko odpowiednie dobranie obu z nich - uwadniania i następnie parametrów suszenia do wilgotności inicjalnej - warunkuje sukces zastosowanego zabiegu. Tym bardziej istotnym było sprawdzenie jakie zmiany molekularne (ekspresja genetyczna i proteomiczna) generują każda z faz, jak i efekt końcowy całego zabiegu.

Z uwagi na fakt, że publikacja była recenzowana, jest opublikowana i ogólnie dostępna, w niniejszej recenzji - bez szczegółowego omawiania rezultatów - pragnę ocenić ją bardzo wysoko ze względu na warsztat wysublimowanych metod badawczych, ogrom analizowanych rezultatów (zarówno zamieszczony w pracy jak i w materiale uzupełniającym) i jednocześnie klarowną ich prezentację, rzeczową analizę oraz trafne spostrzeżenia.

Jednocześnie w kontekście niniejszej publikacji ciekawym jest (1) dlaczego transkrypcja nie jest w pełni skoordynowana z efektami proteomicznymi w badanych procesach oraz (2) jak można wyjaśnić jednoczesne: nadekspresje i ograniczenia syntezy w tych samych grupach białek czy genów (tyczy Fig.6; np. wpływ osmokondycjonowania na białka z grupy LEA i HSP oraz przeciwstawne modyfikacje ekspresji genów białek z grupy HSP podczas kiełkowania)?

Druga z prac eksperymentalnych, pt. „**Enhanced expression of proline synthesis gene *P5CSA* in relation to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress**” - analizuje mechanizmy biochemiczne i ich molekularne podstawy, w kontekście tolerancji kiełkujących nasion rzepaku na zasolenie. Zgodnie z analogicznymi danymi literatury wykazano, że osmokondycjonowane nasiona (rzepak) charakteryzują się lepszymi parametrami kiełkowania nie tylko w warunkach optymalnych, ale szczególnie w warunkach stresowych (zasolenie). Ponadto zauważono, że ten pozytywny efekt utrzymuje się także we wczesnym etapie rozwoju siewek wyrosłych z nasion kondycjonowanych, co przejawiało się poprawą parametrów fotosyntezy, szczególnie w początkowym etapie stresu.

Tolerowanie stresu zasolenia słusznie powiązano ze wzmożoną syntezą proliny podczas osmokondycjonowania nasion. Jej ilość znacznie wzrastała już w trakcie kontrolowanego/ograniczonego uwadniania i pozostawała wysoka po procesie wtórnej desykcji. W publikacji analizowano podstawowe enzymy metabolizmu proliny - zarówno biosyntezy: syntazę pirolino-5-karboksylianową (P5CS; droga kwasu glutaminowego) i aminotransferazę ornityny (OAT; szlak ornitynowy), jak i jej degradacji: dehydrogenazę proliny (PDH). Badania były prowadzone na poziomie molekularnym - ekspresji i pojawiania się transkryptów w kluczowych punktach eksperymentu, i weryfikowane biochemicznie pomiarem aktywności enzymatycznej ww. białek. Wykazano, że podniesiony poziom transkryptów *P5CS* i wzmożona aktywność tego enzymu z jednoczesnym zablokowaniem transkrypcji i aktywności PDH sprzyja akumulacji wolnej proliny w kondycjonowanych nasionach rzepaku i jest powiązana ze wzrostem zawartości endogennego nadtlenu wodoru w tkankach.

Podobnie i w tym przypadku publikacja była recenzowana i jest dostępna w internecie, więc ograniczając zbędne omawianie detali, ze swej strony oceniam ją wysoko. Stanowi ścisłą kontynuację pracy poprzedniej (ten sam materiał i schemat eksperymentalny) rozszerzając dywagacje na temat osmoprimum nasion rzepaku o kontekst warunków suboptymalnych i mechanizmy tolerancji stresu zasolenia. I w tym przypadku na podkreślenie zasługuje zastosowany, bogaty warsztat metodyczny, od testów fizjologicznych (kiełkowanie nasion, wzrost siewek) poprzez biochemiczne (pomiar fluorescencji chlorofilu, ekstrakcje i oznaczenia enzymatyczne oraz poziomu H_2O_2) do technik molekularnych (analizy wybranych transkryptów mRNA, odwrotnie przepisanych i amplifikowanych jako cDNA, a następnie kontrolnie sekwencjonowanych).

W powiązaniu z wynikami uzyskanymi w omówionej publikacji intryguje pytanie, **(3)** czy inne techniki kondycjonowania jak np. bezpośrednie uwadnianie nasion ograniczoną ilością wody lub nieograniczoną ilością wody w ograniczonym czasie - hydropriming - również może generować podobne zmiany w biosyntezie proliny, skoro obserwuje się podwyższoną odporność na stresy tak traktowanych nasion?

Spośród znikomej liczby uwag krytycznych, powziętych jedynie z obowiązku recenzenta, pragnę nadmienić, iż nie rozumiem koncepcji kolejności usytuowania poszczególnych prac w dysertacji (?). Nie była ona podyktowana kryterium nowości, bowiem najnowsza praca jest prezentowana jako druga... Moim zdaniem wstęp do tematu stanowi praca najwcześniejsza z 2013 r. (przeglądowa) i ona winna być prezentowana jako pierwsza, a następnie kolejno, publikacja traktująca generalnie o zmianach molekularnych podczas osmoprimum i kiełkowania w warunkach optymalnych, a na koniec praca traktująca o zwiększonej tolerancji zasolenia dzięki kondycjonowaniu. Zaproponowany układ logiczny dodatkowo pokrywa się z harmonogramem publikacji prac - od najstarszej do najnowszej. Ponadto poprawiłabym tytuł rozprawy na: Molecular and physiological basis of rape (*Brassica napus* L.) seed osmoprimum.

Przedstawione ostatnie sugestie w niczym nie umniejszają wartości prezentowanej dysertacji.

3. Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest ona dobrym opracowaniem naukowym, i że wnosi nowe, istotne odkrycia pozwalające lepiej poznać skomplikowany mechanizm zjawiska kondycjonowania nasion oraz dogłębnie tłumaczy efekty jakie mu towarzyszą. Część eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i wykonana, czego dowodem są publikacja w uznanych czasopismach dziedziny. Udział Doktoranta w ich realizacji był wiodący. Godna uznania jest duża ilość i różnorodność przeprowadzonych przez Niego testów i analiz, bogaty warsztat metodyczny, szczególnie zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych: proteomicznych (rozdziały i analizy białek 2D) i transkryptomicznych (z zastosowaniem mikromacierzy), podczas realizacji zadań badawczych.

Niniejszym stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „**Molecular and physiological basis of rape (*Brassica napus* L.) seeds osmopriming**”, spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 z późn. zm.). W związku z powyższym, **wnioskuję do Rady Wydziału Biologii, Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie jej Autora - mgr Szymona Kubali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie zwracam się z propozycją **wyróżnienia** recenzowanej przeze mnie **dysertacji stosowną nagrodą.**



dr hab. Małgorzata M. Posmyk, prof. nadzw. UŁ