



Recenzja 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”

1. Wprowadzenie

Ruch wody w tkankach roślinnych odbywa się z udziałem trzech głównych dróg transportu. Transportu apoplastycznego, wykorzystującego obszar ścian komórkowych i przestworów międzykomórkowych, transportu symplastycznego, którego funkcjonowanie zapewniają plasmodesmy oraz odbywającego się w poprzek błony komórkowej, transportu przezbłonowego. W korzeniach transport apoplastyczny roztworu glebowego zatrzymuje się na poziomie endodermy, gdzie bariera w postaci inkrustowanych kalozą pasemek Caspary'ego wymusza udział ścieżki symplastycznej i transbłonowej w celu przetransportowania wody do elementów przewodzących walcia osiowego. Transport wody przez ścieżkę transbłonową jest ułatwiany przez akwaporyny, kanały białkowe zaliczane do rodziny białek MIP i obecne w błonach komórkowych u większości organizmów. Członków rodziny akwaporyn roślinnych klasyfikuje się pod kątem ich subkomórkowej lokalizacji. Wyróżnia się zatem akwaporyny błony komórkowej (PIP) w obrębie której, na podstawie analizy związków filogenetycznych, wyodrębnione zostały akwaporyny PIP1 oraz PIP2. Ważną kategorią stanowią akwaporyny tonoplasowe (TIP). Występujące w błonie komórkowej, lecz mniej rozpowszechnione, są akwaporyny błony peribakteroidalnej (NIP) bądź białka o nieznacznej homologii z ludzką akwaporyną 1 (SIP). Akwaporyny, początkowo opisywane jako tzw. kanały wodne, są dziś powszechnie uznawane za uczestniczące w transporcie licznych substancji drobnocząsteczkowych takich jak oczywiście woda, ale również amoniak, CO₂, H₂O₂, a nawet jon boranowy czy krzem. Kluczowa rola w bliskim transporcie wody oraz liczne dodatkowe funkcje powodują, że aktywność akwaporyn wpływa na procesy wzrostowe roślin oraz uczestniczy

w regulacji gospodarki wodnej rośliny podczas aklimatyzacji do zmiennych warunków środowiskowych oraz stresów abiotycznych.

Aklimatyzacja roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych jest regulowana nie tylko przez czynniki endogenne. Niezwykle istotną rolę pełnią w tym procesie interakcje z patogenami roślin oraz organizmami symbiotycznymi, przede wszystkim z grzybami mikoryzowymi. W sytuacji gdy ponad 80% roślin lądowych tworzy w warunkach naturalnych układ symbiotyczny z grzybami mikoryzy arbuskularnej trudno rozpatrywać proces aklimatyzacji do zmieniającego się środowiska inaczej niż w kontekście tej interakcji. **Stąd podjęty przez Panią mgr Ewelinę Paluch-Lubawę trudny i ambitny temat zdefiniowania wpływu mikoryzy na akumulację, kompozycję heterooligomerów oraz ekspresję genów PIP wydaje się być aktualny i istotny dla zrozumienia regulacji gospodarki wodnej roślin podczas stresu suszy i późniejszej dehydratacji.**

2. Ocena merytoryczna

W rozdziale zatytułowanym „Wstęp”, Doktorantka dokonuje przeglądu wiedzy o opisywanych w pracy zagadnieniach. W tej części dominuje problematyka dotycząca akwaporyn. Poruszone zostaje tu w zasadzie pełne spektrum zagadnień, które niezbędne są aby zrozumieć funkcjonowanie tych białek w komórkach roślinnych w świetle współczesnego stanu wiedzy. Opisane są więc w tym miejscu funkcje akwaporyn, ich struktura i specyfika subkomórkowej lokalizacji. Znaczenia akwaporyn w procesach transportowych w roślinie nie sposób zrozumieć jeżeli nie uwzględni się wieloaspektowego zagadnienia regulacji ich funkcjonowania. Dokonuje się ona nie tylko na poziomie ekspresji transkryptów kodujących indywidualne izoformy, lecz obejmuje również szeroki wachlarz modyfikacji i interakcji zachodzących posttranskrypcyjnie, takich jak fosforylacja, heteromeryzacja czy ukierunkowany transport akwaporyn. Zwłaszcza rola oligomeryzacji PIP1 i PIP2 w formowaniu tetrametrów tworzących funkcjonalne kanały wodne jest ważna dla zrozumienia istoty badań opisanych w dalszej części pracy. Na szczęście te zjawiska zostały wyczerpująco zreferowane we Wstępie do rozprawy. Autorka nie pominęła także roli pH, Ca^{2+} , H_2O_2 i regulatorów wzrostu w regulacji działania akwaporyn. Opisowi interakcji grzybów mikoryzy arbuskularnej z roślinami poświęcono mniej miejsca, jednak zaakcentowano aspekty tego zjawiska istotne z punktu widzenia części eksperymentalnej rozprawy, tj. rozróżnienie pomiędzy rolą grzybni mikoryzowej w zwiększeniu pobierania wody i zwiększania dostępności substancji odżywczych, jej wpływ na akumulację hormonów roślinnych oraz funkcjonowanie akwaporyn. **Ten rozdział pracy wskazuje na bardzo dobrą znajomość literatury krajowej i zagranicznej przedmiotu.**

Podstawowe pytanie badawcze, które wydaje się wynikać z uwag zamieszczonych w sekcji

zatytułowanej „Cele pracy” można sformułować następująco. „Czy efekt nawadniający relacji symbiotycznej z grzybem mikoryzowym wpływa na wywołane suszą i/lub rehydratacją zmiany poziomu ilościowego i składu jakościowego akwaporyn błony komórkowej w korzeniach i liściach kukurydzy?” Do tego zagadnienia nawiązuje zamieszczona w tym rozdziale lista celów szczegółowych. Do ich realizacji Doktorantka wykorzystwała szeroki wachlarz metod badawczych obejmujących techniki pomiarów fizjologicznych, analiz proteomiczne i analityczne oraz metody z zakresu biologii molekularnej. Warto podkreślić, że metody opisano bardzo starannie. W rozdziale „Materiały i metody” zamieszczono zarówno szczegółowe opisy procedur jak i wyjaśniono ich podstawy teoretyczne. **Rozdział ten może być z powodzeniem wykorzystany jako zestaw protokołów do stosowania w praktyce laboratoryjnej.** Proponowałbym jedynie zastąpienie w tytule rozdziału 3.2 terminu ‘*hodowla*’, terminem ‘*uprawa*’ (roślin), ponieważ ten pierwszy, w odniesieniu do roślin, rezerwuje się dla procedur uzyskiwania odmian i linii genetycznych.

Należy podkreślić rozległość i różnorodność wykorzystanych technik badawczych, które pozwoliły na prowadzenie badań nad procesami realizującymi się na wszystkich poziomach organizmu roślinnego, od poziomu fizjologicznego po molekularny. Wysoka jakość wyników zaprezentowanych w następnej sekcji rozprawy wskazuje, że pani mgr Ewelina Paluch-Lubawa w bardzo dobrym stopniu opanowała procedury badawcze związane z prezentowanymi zagadnieniami.

Przygotowanie układu eksperymentalnego wymagało przezwyciężenia dwóch ważnych problemów. Pierwszym było zoptymalizowanie poziomu nawożenia roślin tak aby nie obniżać żywotności grzybni mikoryzowej kolonizującej korzenie roślin. Jednocześnie poziom nawożenia powinien być na tyle wysoki aby nie występowały różnice w kondycji roślin mikoryzowanych i niemikoryzowanych. W przeciwnym wypadku różnice w poziomie odżywienia roślin nakładałyby się na reakcje na stres suszy. Uwzględniając te przesłanki dostosowano dawkę nawozową kierując się z jednej strony wynikami pomiaru stopnia kolonizacji korzeni i żywotności grzybni, a z drugiej wynikami pomiarów efektywności asymilacji azotu i węgla przez rośliny, efektywności procesów fotochemicznych i parametrów wzrostowych. Szczególnie użyteczny okazał się indeks wykorzystania azotu (NBI), który pozytywnie korelował z wielkością dawki nawozowej oraz obecnością lub brakiem mikoryzy. Wykorzystując badane parametry znaleziono taką kompozycję nawozową, która umożliwiła prowadzenie upraw roślin mikoryzowanych i niemikoryzowanych o wyrównanym poziomie odżywienia i porównywalnych parametrach wzrostowych.

Drugim wyzwaniem było takie zaplanowanie traktowania roślin suszą aby wyeksponowany został efekt nawadniający mikoryzy, lecz aby jednocześnie nie manifestował się efekt odżywczy tej interakcji symbiotycznej. Cel osiągnięto zwiększając tempo rozwoju suszy glebowej z 13 do 7 dni (następnie stosowano 5 dni rehydratacji). Wyeliminowano w ten sposób, obserwowaną pierwotnie,

zależną od stanu symbiotycznego zmienność parametrów kinetyki fluorescencji chlorofilu oraz indeksu wykorzystania azotu. Jednocześnie wciąż demonstrowano zwiększoną zdolność roślin mikoryzowanych do utrzymania wyższego potencjału wodnego w czasie suszy.

Doktorantka wykazała, że rośliny mikoryzowane charakteryzowały się także szybszą poprawą parametrów wymiany gazowej liści, tj. konduktancji szparkowej i tempa wymiany CO₂ w okresie rehydratacji. Wynik ten świadczy o lepszej gotowości roślin mikoryzowanych do powrotu do stanu fizjologicznego właściwego funkcjonowaniu w warunkach optymalnego nawodnienia. Jednocześnie, wykazano, że rośliny mikoryzowane, w warunkach suszy a także rehydratacji utrzymywały wysoki i stabilny poziom PIP1 i PIP2 w liściach a PIP1 w korzeniach. Tymczasem w roślinach niemikoryzowanych poziom obydwu rodzajów białek spadał znacząco. **Zatem w opisywanym układzie eksperymentalnym zachodziła korelacja pomiędzy warunkowaną przez mikoryzę poprawą warunków wodnych a akumulacją akwaporyn. Sugeruje to związek przyczynowy lecz jeszcze go nie dowodzi. Chciałbym zapytać Doktorantkę jakie analizy funkcjonalne można by w tym celu zaplanować.**

Analiza składu 13 zidentyfikowanych heterokompleksów akwaporyn wykazała, że w korzeniach, w okresie suszy i wznowienia nawadniania, akumulowały się preferencyjnie heteroligomery w których dominowała izoforma PIP2. W liściach, heteroligomery zawierały porównywalne ilości PIP2 i PIP1. Podobnie jak w wypadku analizy indywidualnych izoform, także kompleksy akwaporyn w większym stopniu akumulowane były w czasie suszy, w roślinach mikoryzowanych. **Skład izoform charakteryzował się, jak wykazano, dość wyraźną organospecyficznością. Chciałbym poprosić Doktorantkę o zinterpretowanie tych różnic.**

W toku dalszych badań analizie poddano liście reprezentujące oddalone od siebie piętra liściowe. Uwzględnienie tego aspektu było uzasadnione gdy obiektem badań były dojrzałe, kwitnące rośliny kukurydzy w których liście reprezentujące kolejno rozwijające się segmenty pędu istotnie różniły się efektywnością asymilacji CO₂ i azotu oraz parametrami wymiany gazowej. Analizy prowadzono więc wykorzystując liść przykolbowy, starszy (L5) i liść młodszy (L3) o lokalizacji przywierzchołkowej. Wyższe wartości wykorzystania azotu i wymiany gazowej obserwowano podczas suszy i rehydratacji u roślin mikoryzowanych, w liściach reprezentujących obydwa pokolenia. U roślin niemikoryzowanych niewielkie różnice można było dostrzec pomiędzy liśćmi starszymi i młodszyimi. Autorka wnioskuje na tej podstawie, że mikoryza powoduje zwiększenie efektywności pionowej dystrybucji azotu. **Chciałbym zapytać się czy różnice pomiędzy wielkościami mierzonych parametrów przedstawione na rys 30, 31 i 32 były istotne statystycznie.** W tym samym podrozdziale przedstawiono dane pomiaru wycieku elektrolitów w liściach wskazujące na redukcję tego parametru w liściach roślin mikoryzowanych. Konsekwentnie, Autorka wnioskuje o ochronnym wpływie mikoryzy, zmniejszającym zakres uszkodzeń błon

komórkowych podczas suszy. **Nie znalazłem w rozprawie informacji które pokolenie liści (L3 czy L5) poddano analizie w celu wyznaczenia tego parametru i czy analizowano statystyczną istotność różnic poziomu wycieku elektrolitów pomiędzy roślinami NM i AM. Proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do tej uwagi.**

Wyniki pomiarów zawartości ABA sugerują, że mikoryza może intensyfikować wymianę gazową liści poprzez obniżanie poziomu ABA w liściach roślin doświadczających stresu suszy. Efekt ten obserwowano jednak tylko w starszych, przykolbowych liściach kukurydzy (L5). Przeprowadzenie pomiarów ABA było uzasadnione nie tylko ze względu na kluczową rolę tego hormonu w regulacji reakcji rośliny na suszę lecz także powodu jego bezpośredniego wpływu na ekspresję i aktywność akwaporyn, co demonstrowano szereg razy, także u kukurydzy. **W swojej pracy pani mgr Ewelina Paluch-Lubawa zademonstrowała, że mikoryza może regulować ten efekt i za jego pośrednictwem wpływać na status wodny liści roślin doświadczających deficytu wody.**

W warunkach pogłębiającego się deficytu wody, mikoryza zwiększała poziom endogennego kwasu salicylowego (SA) w liściach kukurydzy. Jak sugeruje Autorka, akumulowany SA może zwiększać retencję akwaporyny w błonach komórkowych poprzez, demonstrowany we wcześniejszych pracach, hamujący wpływ SA na konstytutywną endocytozę białek błony komórkowej. **Czy Autorka ma pomysł w jaki sposób można by zweryfikować tą interesującą hipotezę?**

Szczegółowo przebadano także zmiany poziomu ekspresji genów kodujących poszczególne izoformy PIP1 i PIP2 w liściach reprezentujących różne pokolenia. Zastosowano metodę półilościowej PCR a wyniki normalizowano do poziomu 18S rRNA (w pracy nie do końca precyzyjnie posługiwano się w tym miejscu skrótem „18S RNA”). Wyniki sugerują, że mikoryza koreluje z podwyższonym poziomem ekspresji akwaporyn podczas pogłębiania suszy i późniejszej rehydracji. Dla części izoform był to trend stały a dla innych przejściowy, obserwowany jednak preferencyjnie w liściach położonych niżej, reprezentujących starsze pokolenie (L5). To ciekawe spostrzeżenie może mieć daleko idące konsekwencje, ponieważ jeżeli uwzględnić stymulujący wpływ mikoryzy na parametry wymiany gazowej i redukcję zawartości ABA, to zwiększone poziomy ekspresji akwaporyny mogą sugerować, że wymiernym efektem mikoryzy będzie możliwość prowadzenia przez starsze liście aktywnej gospodarki wodnej. **Jest to jedno z nowatorskich spostrzeżeń zawartych w niniejszej rozprawie.**

3. Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska pt. „Identyfikacja izoform akwaporyn błony komórkowej kukurydzy związanych z mikoryzą arbuskularną oraz ich udziału w symbiotycznej tolerancji na niedobór

wody” autorstwa pani mgr Eweliny Paluch-Lubawej jest 169 stronicowym opracowaniem podzielonym na następujące sekcje: 1. Wstęp (wraz z celami pracy), 2. Materiały i Metody, 3. Wyniki, 4. Dyskusja, 5. Podsumowanie, 6. Streszczenia w języku polskim i angielskim, 7. Załącznik, zawierający podsumowanie wyników identyfikacji spektrometria mas izoform akwaporyn błony komórkowej liści i korzenia kukurydzy, 8. spis literatury.

W pracy znajduje się 15 tabel i 43 rysunki opatrzone wyczerpującymi i klarownymi opisami i legendami. Wszystkie rysunki zostały wykonane z dużą starannością i dbałością o estetykę. Spis literatury cytowanej w niniejszej rozprawie doktorskiej obejmuje aż 335 pozycji. Literatura została dobrana prawidłowo i jest w pełni reprezentatywna dla zagadnień stanowiących treść niniejszego opracowania. Rozprawa zawiera wszystkie rozdziały niezbędne w takich opracowaniach. Wszystkie zastosowane skróty zostały rozszyfrowane w tekście, jednak ze względu na obszerność rozprawy osobny ich wykaz mógłby być użyteczny.

4. Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr Eweliny Paluch-Lubawej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, ważnego pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Starannie zaprojektowany układ eksperymentalny i szeroki zakres zastosowanych technik badawczych umożliwił kompleksową analizę badanego zjawiska, co w połączeniu z dużymi umiejętnościami i pracowitością Doktorantki pozwoliło na ujawnienie nowych prawidłowości i zależności w ramach badanej problematyki. Wyniki licznych eksperymentów zrealizowanych w ramach projektu zostały gruntownie przemyślane, zinterpretowane i skonfrontowane z bardzo obszernym zapleczem danych literaturowych.

Pani mgr Ewelina Paluch-Lubawa przedstawia się, na stronach ocenianej rozprawy, jako dojrzały pracownik naukowy, wyposażony w umiejętności niezbędne do rozwiązywania skomplikowanych problemów badawczych. Rozprawa dostarcza ważnej wiedzy o interakcji rośliny z grzybowym symbiontem, w kontekście aklimatyzacji do deficytu wody.

Rozprawa Pani mgr Eweliny Paluch-Lubawej pt. „Identyfikacja izoform akwaporyn błony komórkowej kukurydzy związanych z mikoryzą arbuskularną oraz ich udziału w symbiotycznej tolerancji na niedobór wody” spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. Wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wielowątkowy charakter i wysoką wartość naukową pracy wnioskuję o wyróżnienie rozprawy i jej Autorki stosowaną nagrodą.

