



dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek, prof. nadzw. UAM  
Zakład Ekofizjologii Roślin  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu  
ul. Umultowska 89,  
61-614 Poznań

Poznań, 28.05.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Olgi Andrzejczak  
pt.: „Metabolizm reaktywnych form azotu w korzeniach pomidora (*Solanum lycopersicum* L.) w warunkach fitotoksycznego oddziaływania *meta*-tyrozyny”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister inżynier Olgi Andrzejczak została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej, prof. nadzw. SGGW (promotor) oraz dr Urszuli Krasuskiej (promotor pomocniczy) w Katedrze Fizjologii Roślin, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W tym miejscu należy podkreślić, że zespół kierowany przez Panią dr hab. Agnieszkę Gniazdowską-Piekarską, prof. nadzw. SGGW ma bogate doświadczenie w prowadzeniu badań nad wyjaśnieniem mechanizmów oddziaływań allelopatycznych oraz działania związków fitotoksycznych, ze szczególnym uwzględnieniem roli endogennego sygnału u roślin tj. tlenku azotu (NO).

W pracy, obejmującej 143 strony, wyróżniono 7 rozdziałów, wśród których znajdują się wstęp literaturowy, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury. Rozprawa zawiera także streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz spis tabel i rysunków. Bibliografia zawiera 285 dobrze dobranych tematycznie pozycji literaturowych, w których jest zawarta dotychczasowa wiedza dotycząca omawianego zagadnienia. W pracy zamieszczono 5 tabel oraz 32 rysunki, które dobrze dokumentują uzyskane wyniki oraz istotnie podnoszą wartość merytoryczną przedstawionej dysertacji. Praca jest napisana, z nielicznymi wyjątkami, bardzo dobrym językiem. Na podkreślenie zasługuje dobre wyważenie ilości informacji zawartych w poszczególnych podrozdziałach. Autorka ustrzegła się moim zdaniem, częściej u doktorantów pokusie, nadmiernego rozbudowywania niektórych podrozdziałów związanych np. z zastosowaną metodą badawczą, czy też objektem prowadzonych badań.

**Nadrzędnym celem recenzowanej pracy było określenie zmian w metabolizmie reaktywnych form azotu (RNS) wynikających z toksycznego działania niebiałkowego aminokwasu - *meta*-tyrozyny (*m*-Tyr) na siewki pomidora (*Solanum lycopersicum* L.).** Efektywnej realizacji celu badań posłużyły cele szczegółowe, które Doktorantka przedstawiła

1





w formie czterech pytań, pozwalających określić wpływ *m*-Tyr na (i) emisję i tkankową lokalizację RNS, (ii) potranslacyjne modyfikacje białek, (iii) ekspresję i/lub aktywność wybranych enzymów systemu antyoksydacyjnego oraz (iv) metabolizm S-nitrozoglutationu (GSNO). Do doświadczeń wybrano dwa stężenia *m*-Tyr hamujące w 50% lub 100% wzrost elongacyjny korzenia siewek pomidora odmiany Malinowy Ożarówski. Postawione przez Doktorantkę cele są interesujące, biorąc pod uwagę fakt, że występujące w ekosystemach biochemiczne oddziaływania z udziałem *m*-Tyr nie są w pełni rozpoznane. Co istotne, praktycznym aspektem zrozumienia fitotoksycznego działania niebiałkowych aminokwasów na organizmy roślinne może być produkcja allelopestycydów.

Część doświadczalną pracy poprzedza obszerny, kompetentnie napisany **Wstęp literaturowy**, w którym Doktorantka omówiła zagadnienia niezbędne do zrozumienia istoty prowadzonych prac badawczych, interpretacji wyników i wyciągania odpowiednich wniosków. W pierwszej kolejności Doktorantka charakteryzuje niebiałkowe aminokwasy, opisując potencjalne drogi ich biosyntezy oraz funkcje jakie mogą pełnić w roślinie. W dalszej części Autorka szczegółowo opisuje przedmiot recenzowanej pracy tj. *meta*-tyrozynę, wydzielaną w formie eksudatów korzeniowych m.in. przez rośliny z rodzaju kostrzew. Doktorantka przedstawiła także szczegółowo metabolizm NO u roślin, począwszy od dróg biosyntezy, po jego współdziałanie z reaktywnymi formami tlenu (ROS), co stanowi doskonale nawiązanie do kolejnego podrozdziału opisującego modyfikacje potranslacyjne białek powodowane przez RNS i ROS. Wstęp literaturowy kończy podrozdział "Metabolizm glutationu a NO". W tej teoretycznej części rozprawy można zauważyć jedynie drobne uchybienia językowe i nieścisłości merytoryczne. Przykładowo, na stronie 42. Doktorantka wskazuje, nadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) jako „sprawcę potranslacyjnych modyfikacji białek np. S-nitrozylacji i nitracji”, jakkolwiek  $\text{ONOO}^-$  jest bezpośrednim czynnikiem nitrującym oraz utleniającym biocząsteczki.

W rozdziale **Materiały i metody** opisano stosowane w trakcie badań metody morfologiczne, histochemiczne, biochemiczne i molekularne. Różnorodne podejścia doświadczalne są zasadne, co przyczyniło się do opublikowania części wyników, wchodzących w skład dysertacji. Przedstawiony w tym rozdziale schemat prowadzonego doświadczenia (Ryc. 3.1) jasno przedstawia pomysł badawczy i pozwala na prześledzenie kolejno podejmowanych etapów badań.

Rozdział **Wyniki** został podzielony na 11 podrozdziałów, w których opisano prowadzone kolejno badania i uzyskane w efekcie wyniki. Konsekwentnie realizując postawione cele badawcze Autorka dokumentuje, że indukowanemu *m*-Tyr zahamowaniu wzrostu korzeni siewek pomidora towarzyszy wzrost poziomu RNS tj. NO i  $\text{ONOO}^-$ , co udokumentowano metodą histochemiczną oraz fluorymetryczną. Korzenie siewek wzrastających w obecności *m*-Tyr wykazywały również zmiany w ilości potranslacyjnie modyfikowanych białek, tak na drodze karbonylacji, jak i nitrowania. Co istotne, również na tym etapie badań, Doktorantka posłużyła się dwoma metodami, pozwalającymi zarówno na





ocenę zmian jakościowych, jak i ocenę ilościową karbonylowanych oraz nitrowanych białek. Co ciekawe, Autorka zanotowała istotne zmiany we wzorze nitroproteomu, wskazując wzrost ilości immunoreaktywnych prążków zarówno podczas przedłużającej się ekspozycji na *m*-Tyr, jak i wraz ze wzrostem stężenia tego niebiałkowego aminokwasu. Sądzę, że przyszła identyfikacja prążków różnicujących badane warianty znacznie wzbogaci wiedzę na temat mechanizmu działania *m*-Tyr. W dalszej kolejności Doktorantka stwierdza, że traktowanie korzeni pomidora *m*-Tyr prowadzi do zmian w aktywności ważnych enzymów systemu antyoksydacyjnego tj. reduktaza glutationowa oraz peroksydaza glutationowa. Ponadto, wykorzystując metodę elektroforezy natywnej, Autorka nie stwierdziła zmian w aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD); jakkolwiek załączona na ryc. 4.9.1. dokumentacja elektroforegramów wskazuje wyraźnie obniżoną aktywność drugiej izoformy ZnCuSOD w 72 godzinie po potraktowaniu 250  $\mu$ M *m*-Tyr. Uważam, że zastosowanie analizy densytometrycznej z pewnością uwypukliłoby różnice pomiędzy badanymi wariantami. W dalszym etapie badań scharakteryzowano kluczowy enzym metabolizmu NO tj. reduktazę S-nitrozoglutationu (GSNOR). Badania objęły zarówno analizy na poziomie aktywności enzymatycznej, jak i ekspresji białka oraz akumulacji transkrypty *GSNOR*. Doktorantka opisała wzrost ekspresji genu kodującego *GSNOR*, skorelowany ze wzrostem zawartości białka i aktywności enzymu. Stwierdziła ponadto, zależną od stężenia oraz czasu ekspozycji na *m*-Tyr, indukcję ekspresji genów kodujących różne izoformy SOD, przy czym w każdym analizowanym wariantcie zanotowano kilkukrotny wzrost akumulacji transkrypty genu *FESOD*. Niewątpliwie, uzyskane dane wskazują, że indukcja stresu nitro-oksydacyjnego jest wtórnym mechanizmem działania *m*-Tyr podczas hamowania wzrostu elongacyjnego korzeni siewek pomidora. Stwierdzam, że Autorka zrealizowała wszystkie stawiane w rozprawie doktorskiej cele.

**Dyskusja** uzyskanych wyników jest kompleksowa i wyczerpująca, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Doktorantka wkomponowała w tę część dysertacji estetyczne, czytelne schematy ułatwiające zrozumienie omawianych zagadnień i podnoszące wartość rozprawy.

Pani mgr inż. Olga Andrzejczak podsumowując rozprawę doktorską przedstawiła cztery nadrzędne **wnioski** oraz 14 wniosków szczegółowych. Moim zdaniem z powodzeniem można zredukować liczbę wniosków szczegółowych bez żadnego uszczerbku dla wartości rozprawy. Pewne wątpliwości formalne budzi jedynie nadrzędny wniosek II., w którym Doktorantka przywołuje wyniki eksperymentalne zawartości reaktywnych form tlenu w korzeniach siewek pomidora, które nie są integralną częścią rozprawy.

Po analizie całości dysertacji, nasuwa się kilka pytań, na które nie można uzyskać odpowiedzi w treści rozdziałów Wyniki i Dyskusja, dlatego proszę o ustosunkowanie się do nich:





- Na podstawie analizy lokalizacji ONOO<sup>-</sup> wykonanej w mikroskopie konfokalnym Autorka twierdzi, że „silniejszą fluorescencję obserwowano dla siewek pomidora traktowanych m-Tyr po 24h, głównie w komórkach epidermy i czapeczce korzeniowej”. W mojej opinii trudno dostrzec powyższą zależność na załączonej dokumentacji (Ryc. 4.3.2. A-C). Fluorescencja korespondująca z obecnością ONOO<sup>-</sup> wydaje się być nawet słabsza pod wpływem 24-godzinnej ekspozycji na m-Tyr, aniżeli w wariancie kontrolnym. Dlaczego, w celu precyzyjnego wnioskowania, nie wykonano analizy densytometrycznej obrazów (ryc. 4.3.1 i 4.3.2) przedstawiających lokalizację RNS?
- Jak wytłumaczyć istotne statystycznie obniżenie emisji NO w 24 godzinie po potraktowaniu 250 μM m-Tyr, którą odnotowano przy zastosowaniu metody fluorymetrycznej, skoro analiza histochemiczna wskazuje wyraźny wzrost fluorescencji w tym samym punkcie czasowym eksperymentu?
- Immunodetekcja białek karbonylowanych wskazała najsilniej wybarwione prążki w wariancie pochodzącym z korzeni roślin traktowanych 250 μM m-Tyr przez 72h, jednakże analiza ilościowa prezentuje istotne statystycznie obniżenie zawartości grup karbonylowanych białek. Jak wytłumaczyć tę rozbieżność?
- Dlaczego aktywność enzymatyczną GSNOR wyrażono w przeliczeniu na świeżą masę?
- Czy rozważano detekcję GSNO w celu uzyskania kompleksowego obrazu metabolizmu NO w odpowiedzi na m-Tyr?
- Czy stosowana w doświadczeniach koncentracja m-Tyr mieści się w zakresie stężeń występujących w warunkach naturalnych?

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca jest napisana klarownym językiem i wpisuje się w nowoczesne, oparte na wieloaspektowym podejściu, badania dotyczące biologii tlenu azotu u roślin. Pani mgr inż. Olga Andrzejczak przedstawiła bardzo dobre umiejętności w zakresie posługiwania się różnorodnymi metodami badawczymi, a sposób opracowania rozprawy i duża swoboda poruszania się w omawianym temacie świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Należy podkreślić, że część wyników została opublikowana w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR) tj. *Nitric Oxide* (2016, **IF 3,760**) oraz *Plant Physiology and Biochemistry* (2018, **IF 2,724**). Autorka rozprawy jest także laureatką konkursu PRELUDIUM ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki.

Do najważniejszych, wyróżniających osiągnięć rozprawy zaliczam przede wszystkim wskazanie zmian we wzorcu nitroproteomu korzeni siewek pomidora pod wpływem m-Tyr.



Jedynie z powinności recenzenta przytaczam kilka z zauważonych błędów edytorskich i niedociągnięć językowych, przykładowo: str. 28: "...wspomagające systemową odpowiedź" powinno być - systemiczną; str. 35: "...organizmach podobnych do grzybów" powinno być – organizmach grzybopodobnych; str. 117: "...funkcja sygnalizacyjna" powinno być – sygnałowa. Używane kilkakrotnie w pracy sformułowanie "przedstawiono typowy wynik" (np. str. 65) zamieniłabym na "przedstawiono wynik reprezentatywny". Ponadto, Doktorantka pisze o „odmianach słonecznika o różnej wrażliwości na zakażenie patogenem”, co w odniesieniu do interakcji roślina-patogen należałoby opisać jako zróżnicowanie w podatności lub odporności na dany patogen.

#### Wniosek końcowy

W świetle wyżej przedstawionej, pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pani mgr inż. Olgi Andrzejczak wnoszę do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań oraz dojrzałą dyskusję uzyskanych wyników, wnoszę o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

dr hab. Magdalena Arasimowicz-Jelonek, prof nadzw. UAM