



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, 30.04.2017

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Ciąčka
pt.: „Udział poliamin i tlenu azotu w regulacji spoczynku i kiełkowania
zarodków jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) ”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Katarzyny Ciąčka została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej prof. nadzw. SGGW, w Katedrze Fizjologii Roślin, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Praca jest bardzo obszernym opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 161 stronach maszynopisu, z 42 rycinami oraz 9 tabelami. Tekst ocenianej rozprawy doktorskiej obejmuje istotne części składowe tj. streszczenie pracy w języku polskim i angielskim, przegląd literatury (zatytułowany jako wstęp literaturowy), cel pracy, materiały i metody, wyniki badań, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury obejmujący aż 389 pozycji. Rozprawa zawiera także wykaz stosowanych skrótów oraz spis rysunków i tabel.

Pracownicy tworzący zespół naukowy Pani dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej prof. nadzw. SGGW od lat prowadzą badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów regulujących spoczynek i kiełkowanie nasion. Zespół udokumentował m.in., że tlenek azotu (NO), endogenna cząsteczka sygnałowa, pełni istotną funkcję w regulacji kiełkowania nasion różnych gatunków roślin, w tym również nasion jabłoni, gatunku będącego obiektem badań przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej. Jak wykazały badania zespołu, aktywność biologiczna NO podczas przełamania spoczynku i stymulacji kiełkowania nasion związana jest m. in. ze zmianą bilansu hormonalnego kwasu abscysynowego (ABA) i etylenu oraz przejściową, wzmożoną produkcją reaktywnych form tlenu (RFT). **Celem recenzowanej pracy było dalsze wyjaśnienie mechanizmu działania NO w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni poprzez określenie zależności pomiędzy NO a regulatorami wzrostu i rozwoju tj. poliaminami (PA).**

Część teoretyczną pracy - **wstęp literaturowy** - czyta się z dużą przyjemnością, jest napisana jasnym, zwięzłym językiem (z niewielkimi wyjątkami), co świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury. Na podkreślenie zasługuje dobre wyważenie proporcji ilości informacji zawartych w poszczególnych podrozdziałach, w pełni wystarczające do dalszego śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągania odpowiednich wniosków. W pierwszej kolejności Doktorantka charakteryzuje czynniki regulujące spoczynek i kiełkowanie nasion, opisując udział fitohormonów (tj. ABA, gibereliny, etylen), regulatorów wzrostu i rozwoju (PA) oraz niskocząsteczkowych związków o charakterze sygnałowym tj. RFT i cyjanowodór. Na uwagę zasługuje wskazanie w tej części rozprawy, iż interakcje RFT z kwasami nukleinowymi oraz białkami mogą mieć charakter pozytywnego regulatora kiełkowania nasion na drodze selektywnej oksydacji mRNA lub białek. W dalszej części Autorka szczegółowo opisuje rolę związków stanowiących przedmiot recenzowanej pracy, tj. PA i NO, przedstawiając zarówno mechanizmy syntezy, status metaboliczny, jak i funkcje w kontekście biologii nasion. Podrozdział "Współdziałanie PA i NO w regulacji procesów fizjologicznych u roślin", kończący rozdział wstęp literaturowy, wskazuje na metaboliczną zależność NO i PA, co stanowi doskonały punkt wyjścia dla postawionego przez Doktorantkę celu pracy.

W rozdziale tym można zauważyć jedynie drobne nieścisłości. Przykładowo, na stronie 48. Doktorantka wymienia stosowane w warunkach laboratoryjnych donory NO, wskazując m.in. 3-morfolino-sydoniminę (SIN-1), związek który obok NO generuje jednocześnie anionorodnik ponadtlenkowy. Jednakże, ze względu na szybkość reakcji przebiegającej pomiędzy uwalnianymi cząsteczkami (NO i anionorodnik ponadtlenkowy), SIN-1 traktowany jest jako donor innej reaktywnej formy azotu (RFA) - nadtlenoazotynu i jedynie względnie niskie stężenie tlenu w warunkach *in vivo* zapewnia środowisko, w którym SIN-1 można traktować jako donor NO. Następnie na ryc. 1.7. Doktorantka przedstawiła "źródła biosyntezy NO w komórce roślinnej"; jakkolwiek, odnosząc się ogólnie do komórki roślinnej, jak wskazuje tytuł ryciny, należałoby uwzględnić także plastydy, w których wykazano zależną do L-argininy syntezę NO z udziałem NOS-podobnego enzymu. Ponadto, cytoplazmę należałoby uzupełnić o możliwość syntezy NO w wyniku aktywności białka o charakterze ssaczego typu NOS, jak udokumentowano eksperymentalnie w komórkach siewek kukurydzy.

W rozdziale **Materiały i Metody** opisano stosowane w trakcie badań metody morfologiczne, fizjologiczne, biochemiczne i molekularne. Podejścia doświadczalne są zasadne, co przyczyniło się do opublikowania znaczącej części wyników, wchodzących w skład dysertacji. Za bardzo cenne i "twórcze" uważam zastosowany sposób traktowania zarodków jabłoni gazowym NO, który eliminuje możliwość oddziaływania substancji

ubocznych, uwalnianych podczas aplikowania tzw. donorów NO. W tym miejscu należy jednak zapytać, czy znane jest tempo i kinetyka NO uwalnianego z zakwaszonego roztworu NaNO_2 oraz jakie stężenie NO uzyskano w szklanym naczyniu o pojemności 0,5 l w następstwie przebiegającej reakcji NaNO_2 z HCl? Uzupełnienia wymaga także sposób traktowania zarodków jabłoni PA w obecności zmiatacza NO, cPTIO. Czy roztwory podawane były sekwencyjnie, czy też sporządzano jeden roztwór zawierający daną PA i zmiatacz NO?

Rozdział **Wyniki** to najobszerniejsza część dysertacji, obejmująca kilka podrozdziałów, w których opisano prowadzone kolejno badania i uzyskane w efekcie wyniki. Co istotne, opis każdej analizy został zakończony podsumowaniem, co ułatwia zapoznanie się z przedstawianymi wynikami. I tak, w pierwszej części Doktorantka dokumentuje, iż putrescyna (Put) i spermidyna (Spd) podobnie jak NO, usuwają spoczynek zarodków jabłoni, co wiąże się z akumulacją reaktywnych form azotu i tlenu. Z kolei, spermina (Spm) odpowiada za utrzymanie spoczynku zarodków jabłoni, a strukturalny analog argininy tj. kanawanina oraz zmiatacz NO sprzyjają pogłębieniu spoczynku. Dalsze eksperymenty wskazują, iż ustępowanie spoczynku i kiełkowanie zarodków jabłoni w odpowiedzi na traktowanie PA (Put i Spd) oraz NO prowadzi do istotnych modyfikacji metabolizmu argininy. W odniesieniu do zarodków traktowanych NO, Doktorantka stwierdziła wzrost stężenia wolnych PA w osiach i korzeniach zarodkowych, przy czym najliczniej reprezentowaną PA stanowiła Put. Obserwowanym zmianom towarzyszył wzrost aktywności arginazy oraz wzrost stężenia ornityny, która stanowi bezpośredni prekursor Put. W ostatnim etapie analizowano zmiany w ekspresji genów związanych z metabolizmem PA w osiach zarodków i korzeniach siewek uzyskanych z zarodków traktowanych NO i jego zmiataczem. Doktorantka wskazała modyfikacje na poziomie akumulacji transkryptów genów kodujących enzymy uczestniczące zarówno w syntezie PA (tj. dekarboksylaza S-adenozylometioniny, *MdSAMDC1*, syntaza spermidyny, *MdSPDS2a* oraz syntaza sperminy, *MdSPMS*), jak i w ich katabolizmie (tj. oksydaza poliaminowa, *MdPAO*).

Dyskusja uzyskanych wyników jest kompleksowa i wyczerpująca, co ponownie wskazuje na bardzo dobrą znajomość literatury przedmiotu. Estetyczne, czytelne i dobrze wkomponowane schematy ułatwiają zrozumienie omawianych zagadnień i podnoszą wartość rozprawy.

Pani mgr Katarzyna Ciąćka podsumowując rozprawę doktorską formuje trzy nadrzędne **wnioski** oraz 12 wniosków szczegółowych. Moim zdaniem z powodzeniem można zredukować liczbę wniosków szczegółowych bez żadnego uszczerbku dla wartości rozprawy.

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

- Czy NO może bezpośrednio reagować z PA?
- We wstępie literaturowym Doktorantka pisze "Podczas pierwszych etapów kiełkowania (imbibicji i fazy katabolicznej), z racji ograniczonego dostępu O₂, oksydacyjny typ biosyntezy NO wydaje się odgrywać mniej istotną rolę w tkankach zarodka". Z kolei, w Dyskusji Doktorantka argumentuje, iż "...w warunkach laboratoryjnych, z uwagi na nieograniczoną dostępność O₂, należy raczej wykluczyć funkcjonowanie reakcji redukujących jako podstawowych dróg biosyntezy NO". Jaki zatem typ biosyntezy NO dominuje podczas przełamania spoczynku w nieizolowanych zarodkach nasion jabłoni?
- Dlaczego lokalizację tkankową w osiach zarodków spoczynkowych traktowanych poliaminami, argininą i kanawaniną wykonano jedynie dla anionorodnika ponadtlenkowego, natomiast pomiar ilościowy wykonano tylko dla nadtlenku wodoru? Czy nie łatwiej byłoby porównać te dwa parametry stosując taką samą metodę?
- Jak wytłumaczyć kilkukrotny wzrost aktywności NOS-podobnej w osiach zarodków spoczynkowych traktowanych NO w drugim dniu kultury (Rys. 4.14)?

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca świetnie wpisuje się w nowoczesne, oparte na wieloaspektowym podejściu, badania dotyczące biologii tlenu azotu u roślin. Pani mgr Katarzyna Ciąćka wykazała 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. Ponownie podkreślę, że znacząca część wyników została opublikowana w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR), w tym, w czasopiśmie *Nitric Oxide* (IF=3,760), które poświęcone jest zagadnieniom związanym z NO w organizmach żywych. Za największe osiągnięcie uważam wskazanie zależności występujących pomiędzy NO i PA oparte na przemianach argininy oraz cyklu mocznikowego podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni. Jedynie z powinności recenzenta przytaczam kilka z zauważonych błędów edytorskich i niedociągnięć językowych: str. 29: "...niskocząsteczkowe związków" powinno być - związki; str. 33: "...obronnie przed patogenami" powinno być - obronie; str. 37: "...skonjugowanych PA" powinno być - skoniugowanych; str. 39: "...przemieszanie PA" powinno być - przemieszczanie; str. 99: "...kontrolny" powinno być - kontrolnych. Ponadto, używane



kilkukrotnie w pracy sformułowanie "w trakcie przedłużającej się kultury..." (np. str. 59) uzupełniłabym o "przedłużającej się w czasie kultury" lub zamieniłabym na "8-dniowa kultura".

Wniosek końcowy

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny pracy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Ciąćka stwierdzam, że przedstawiona rozprawa w pełni odpowiada wymaganiom ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz stawianym wymaganiom pracom doktorskim. Na tej podstawie wnoszę do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Ciąćka 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