

Prof. dr hab. Stanisława Pukacka  
Instytut Dendrologii PAN  
62-035 Kórnik

Kórnik, 25. 04. 2017.

### Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Ciącka pt. „**Udział poliamin i tlenu azotu w regulacji spoczynku i kielkowania zarodków jabłoni (*Malus domestica* Borkh.)**” wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin na Wydziale Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie.

Praca doktorska mgr Katarzyny Ciącka jest fragmentem badań jakie Autorka wykonała pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej dotyczących molekularnych mechanizmów ustępowania spoczynku zarodków jabłoni, a w szczególności roli poliamin i tlenu azotu w tym procesie. Badania były finansowane przez NCN w ramach projektu NN 303821840, przyznanego dr hab. Agnieszce Gniazdowskiej-Piekarskiej. Rozprawa doktorska obejmuje wyniki Autorki dotąd nieopublikowane i opublikowane w trzech artykułach:

1. Krasuska U., Ciacka K., Bogatek R., Gniazdowska A. 2014. Polyamines and nitric oxide link in regulation of dormancy removal and germination of apple (*Malus domestica* Borkh.) embryos. *J. Plant Growth Regul.*, 33:590-601.
2. Krasuska U., Ciacka K., Orzechowski S., Fettke J., Bogatek R., Gniazdowska A. 2016. Modification of the endogenous NO level influences apple embryos dormancy by alterations of nitrated and biotinylated protein patterns. *Planta*, 244: 877-891.
3. Krasuska U., Ciacka K., Gniazdowska A. 2016. Nitric oxide-polyamines cross-talk during dormancy release and germination of apple embryos. *Nitric Oxide*. doi. org/ 10.1016/j.niox.2016.11.003.

Praca liczy 149 stron. Poprzedzona jest Streszczeniami w j. polskim i angielskim, oraz Spisem treści. Następnie, Autorka umieściła również Wykaz skrótów stosowanych w tekście oraz Spis rysunków i tabel. Szczególnie ten pierwszy dodatek jest bardzo przydatny przy czytaniu pracy. Poza tym struktura pracy jest typowa dla prac doktorskich w Polsce. Jej poszczególne rozdziały to: **1.** Wstęp literaturowy liczący 35 stron, **2.** Cel pracy (2 strony), **3.**

Materiały i metody (15 stron), 4. Wyniki badań (37 stron), 5. Dyskusja (18 stron), 6. Podsumowanie i wnioski (2 strony), 7. Spis literatury (23 strony).

Wstęp zawiera przegląd literatury dotyczący takich zagadnień jak: spoczynek i kiełkowanie nasion, czynniki regulujące spoczynek i kiełkowanie nasion, poliaminy (PA) jako regulatory wzrostu i rozwoju roślin, szlaki ich biosyntezy i transportu w roślinach oraz degradacji, udział PA w regulacji spoczynku i kiełkowania nasion, tlenek azotu (NO) jako cząsteczka sygnałowa, synteza NO w nasionach, mechanizmy regulacji zawartości NO w komórkach, rola NO w ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion oraz współdziałanie PA i NO w regulacji procesów fizjologicznych w roślinach.

Wiadomo, że do tej pory mechanizm ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion, pomimo wielu badań i opracowań naukowych nie jest jeszcze do końca poznany. Autorka, jako **cel badawczy** niniejszej pracy wyznaczyła dokładniejsze poznanie mechanizmu działania NO, poprzez wyjaśnienie zależności/współdziałania tej cząsteczki z PA w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni (*Malus domestica* Borkh.). Tak postawione zagadnienie do tej pory nie było wyjaśniane.

Opis stosowanych metod badawczych jest przejrzysty i dokładny. Zauważyłam jednak brak informacji: na str. 65 - do jakiej zawartości wody były podsuszane nasiona jabłoni po zbiorze?

W pierwszym etapie badań Autorka przeprowadziła testy kiełkowania spoczynkowych zarodków jabłoni oraz zarodków traktowanych NO, jego wymiataczem cPTIO, PA: putrescyną (Put), spermidyną (Spd) i sperminą (Spm), jak również arginina (Arg) oraz kanawanią (Kan) i difluorometyloornityną (DFMO). Dwa ostatnie związki są inhibitorami biosyntezy PA. Wykazała, że krótkotrwałe traktowanie zarodków NO prowadziło do ustąpienia spoczynku i kiełkowania zarodków w 62% po 8 dniach od traktowania, natomiast cPTIO powodował pogłębienie spoczynku. Put i Spd najbardziej stymulowały kiełkowanie w przy stężeniu 0.2 mM, natomiast Spm w stężeniu 0.5 mM hamowała kiełkowanie. Arg w stężeniu 0.2 mM stymulowała kiełkowanie a Kan opóźniała lub całkowicie hamowała kiełkowanie, zależnie od stężenia, natomiast DFMO w bardzo niewielkim procencie stymulowało kiełkowanie. Na podstawie tych testów Autorka stwierdziła, że Pa: Put i Spd oraz NO można uznać za stymulatory kiełkowania zarodków jabłoni. Również Arg jako prekursor PA może być promotorem tego procesu, natomiast Spm utrzymuje spoczynek. cPTIO i Kan hamują kiełkowanie zarodków.

Równocześnie Autorka wykazała, że traktowanie spoczynkowych zarodków jabłoni stymulatorami kiełkowania (NO, Put, Spd i Arg) prowadzi do ustąpienia spoczynku i prawidłowego rozwoju siewek. Natomiast traktowanie Spm nie prowadzi do pełnego wyeliminowania symptomów spoczynku, a podanie zarodkom cPTIO lub Kan powoduje zahamowanie wzrostu siewek i anomalie rozwojowe. Kan powoduje zahamowanie kiełkowania zarodków niespoczynkowych i zarodków traktowanych NO.

Następnym etapem badań było wykazanie, że stymulatory ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni powodują wzrost poziomu RNS: NO i ONOO<sup>-</sup> oraz ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup>). W tym momencie mam wątpliwość co do możliwości interpretowania kumulacji anionorodnika ponadtlenkowego patrząc na załączone fotografie. Są one niewyraźne. Co prawda Autorka powołuje się na publikację Krasuska i in. 2014, w której różnice w kumulacji anionorodnika ponadtlenkowego w zarodkach jabłoni traktowanych PA i Arg są bardziej widoczne. Niemniej jednak chciałabym zapytać czy nie lepiej było by zastosować inną metodę do oznaczania poziomu tej cząsteczki w zarodkach, np. Doke (1983).

W kolejnych badaniach Autorka oznaczała aktywność NOS-podobną w zarodkach jabłoni traktowanych NO, cPTIO, PA oraz Arg i Kan. Po 2 dniach kultury stwierdziła silny wzrost aktywności NOS-podobnej w zarodkach traktowanych NO oraz dwukrotny wzrost w zarodkach traktowanych Put, Spd oraz Arg. W 8-mym dniu hodowli tylko w zarodkach traktowanych Put i Arg aktywność NOS-podobna była wyższa niż w kontroli i innych wariantach traktowania. cPTIO najbardziej hamowało aktywność NOS-podobną tak w 2 jak i 8 dniu kultury. Podobnie Kan także w 8 dniu.

W zarodkach traktowanych NO, cPTIO oraz PA w 8 dniu kultury Autorka stwierdziła duży wzrost zawartości Arg pod wpływem PA, a w szczególności Put i Spd i niewielki pod wpływem Spm. Natomiast aktywność arginazy była istotnie wyższa w zarodkach traktowanych NO, Put i Kan w 2 dniu kultury, oraz Put i Spd w 8 dniu. W ten sam sposób traktowanych zarodkach Autorka stwierdziła zmiany stężenia ornityny i mocznika. Stężenie ornityny było najwyższe po traktowaniu zarodków NO w 2 i 8 dniu kultury oraz po traktowaniu Put i Spd w 8 dniu (po zakończeniu kiełkowania). Podobnie, wzrost stężenia mocznika stwierdzono po potraktowaniu zarodków NO, Put i Spd po 2 i 8 dniach kultury.

W zarodkach jabłoni traktowanych NO wzrastała zawartość wolnej Put już w 2 tygodniu kultury i dalszy jej wzrost odnotowano w 8 dniu. Wzrost zawartości Spd i Spm następował tylko w 8 dniu kultury. Nie stwierdzono zmian w zawartości PA w stosunku do kontroli w nasionach traktowanych cPTIO.

Tlenek azotu miał istotny wpływ na aktywność oksydaz poliaminowych (PAO) w zarodkach jabłoni. Autorka stwierdziła wielokrotny wzrost aktywności PAO w 2 i 8 dniu kultury w zarodkach traktowanych NO. Znacząco wyższą aktywność PAO wykazywały próbki gdy substratem była Spm w porównaniu z Spd.

Ostatnią część Wyników stanowią badania poziomu ekspresji genów kodujących enzymy związane z metabolizmem PA w zarodkach jabłoni traktowanych NO i cTPIO. Były to geny związane z syntezą PA (syntaza spermidyny 1 i 2a, syntaza sperminy), z katabolizmem PA (oksydaza poliamin), geny związane ze szlakiem syntezy etylenu (dekarboksylaza S-adenozylometioniny C1 i C2. Autorka wykazała, że traktowanie zarodków NO (stymulatorem kiełkowania) powoduje wzrost poziomu transkryptów związanych z syntezą PA (głównie Spd), ich katabolizmem (głównie Spm). Zauważono także zmniejszony poziom ekspresji genu związanego z biosyntezą Spm, która podtrzymuje spoczynek. W zarodkach, w których spoczynek został przerwany traktowaniem NO stwierdzono podwyższony poziom ekspresji genu dekarboksylazy S-adenozylometioniny.

Wyniki badań Autorka przedstawiła na 28 wykresach i 5 tabelach. Są one dobrze opisane i starannie wykonane.

W Dyskusji nad uzyskanymi wynikami Autorka zmierza konsekwentnie do wykazania, że istnienie sieci współdziałania poliamin i tlenu azotu odgrywa ważną rolę w mechanizmie ustępowania spoczynku zarodków jabłoni. Wskazują na to następujące wyniki: 1) poliaminy takie jak putrescyna (Put) i spermidyna (Spd) stymulowały ustępowanie spoczynku i kiełkowanie zarodków jabłoni 2) równoczesne traktowanie zarodków cTPIO i PA (z wyjątkiem Spm) hamowało ich kiełkowanie 3) stymulacja kiełkowania zarodków przez PA związana była ze wzrostem produkcji RNS, głównie NO oraz wzrostem aktywności NOS-podobnej 4) była ona również związana ze wzrostem produkcji ROS ( $H_2O_2$  i  $O_2^{\cdot-}$ ). Tych efektów nie osiągnięto traktując zarodki jabłoni sperminą (Spm) i kanawaniną (Kan) - inhibitorem syntezy PA. Łączne oddziaływanie NO i PA na proces ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni Autorka wykazała także przez stwierdzenie, że Kan hamuje kiełkowanie niespoczynkowych zarodków jabłoni stratyfikowanych lub traktowanych NO. Poza tym wykazała, że krótkotrwałe traktowanie zarodków NO modyfikowało zawartość PA w tkankach a najwyższe stężenie osiągała Put. Bardzo ważnym argumentem istnienia współdziałania PA z NO w procesie ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion jabłoni było wykazanie, że stymulacja kiełkowania donorami NO prowadziła do zwiększonej ekspresji genów kodujących enzymy biosyntezy poliamin (dekarboksylazy S-

adenozylometioniny – *MdSAMDC1* i syntazy spermidyny – *MdSPDS2a*) oraz ich katabolizmu (oksydazy poliaminowej - *MdPAO*). Obniżenie poziomu transkryptu *MdSPMS* dotyczyło biosyntezy Spm, która podtrzymuje spoczynek zarodków.

Na końcu pracy Autorka wypunktowała Wnioski dotyczące trzech głównych osiągnięć jakie uzyskała w Pracy, które potwierdzają jej założenia

1. Usuwanie spoczynku i stymulacja kiełkowania zarodków jabłoni zależne od PA (Put i Spd) jest związane ze wzmożoną produkcją ROS i RNS
2. Zależne od PA lub NO ustępowanie spoczynku i kiełkowanie zarodków jabłoni związane jest z regulacją metabolizmu argininy
3. Korzystne oddziaływanie NO na ustępowanie spoczynku i kiełkowanie zarodków jabłoni jest powiązane z regulacją metabolizmu PA.

Jest to bardzo staranne zakończenie pracy.

W Spisie literatury są pewne niedopatrzenia. Cztery prace znajdujące się w Spisie nie są cytowane w pracy, natomiast dwie są cytowane w pracy a nie ma ich w Spisie. Pozycja Polacco JC, Jolland MA. cytowana jest jako Polacco J.C., Holland MA.

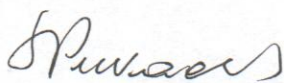
Na końcu chciałabym podkreślić, że na 389 prac cytowanych znacząca większość (80%) była opublikowana po 2000 roku.

Generalnie, Praca napisana jest dobrze. Niekiedy zdarzają się pewne niedociągnięcia gramatyczne, np. Autorka pisze: „..w nasionach buku, czy świerku” zamiast buka czy świerka, lub też często używa „iż” zamiast „że”.

Jeśli chodzi o wartość merytoryczną pracy to uważam, że została ona oceniona przez recenzentów 3 prac, które wymieniłam na początku, a które znalazły się w dobrych czasopismach naukowych. Prace te zawierają prawie wszystkie wyniki badań przedstawionych w Pracy Doktorskiej z małymi wyjątkami dotyczącymi pewnych podsumowań itp.

Dlatego jestem zdania, że recenzowana praca w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk biologicznych.

Stawiam wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Ciąćka do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Stanisława Pukačka