



Łódź, 10 IX 2020 r.

**WYDZIAŁ BIOLOGII  
i OCHRONY  
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

**Prof. dr hab. Małgorzata M. Posmyk**

Katedra Ekofizjologii Roślin

tel. +48 42 635 44 22

e-mail: [malgorzata.posmyk@biol.uni.lodz.pl](mailto:malgorzata.posmyk@biol.uni.lodz.pl)

**R E C E N Z J A**  
rozprawy doktorskiej

pt. „**Molekularny mechanizm działania tlenu azotu, w podejściu transkryptomycznym i proteomicznym, podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion jabłoni**”

wykonanej przez **mgr Paulinę A. Andrykę-Dudek**  
pod kierunkiem Prof. dr hab. Agnieszki Gniazdowskiej-Piekarskiej,  
w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolnictwa i Biologii,  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**1. Uwagi ogólne**

Żywołność nasion i kontrola ich kiełkowania są podstawą dla prawidłowego funkcjonowania ekosystemu. Ma to również kluczowe znaczenie dla produktywności systemów rolniczych i ogrodniczych, zwłaszcza przy ograniczonym klimatem okresie wegetacji. Większość roślin ewolucyjnie wykształciła mechanizmy zabezpieczające nasiona przed kiełkowaniem w niekorzystnych warunkach środowiskowych – jest to spoczynek względny – a pewna ich część, dodatkowo, mechanizmy hamownia kiełkowania mimo jeszcze korzystnych warunków – co pozwala im w stanie anabiozy spoczynku bezwzględnie przetrwać np. zimę oraz, co do dyspersji przestrzennej gatunku dodaje swego rodzaju dyspersję w czasie. Wiedza o rodzajach spoczynku nasion jest gromadzona od lat. Dla potrzeb hodowli i uprawy roślin poznano i stosuje się różne metody przełamywania spoczynku bezwzględnego – w zależności od jego etiologii m.in. skaryfikację fizyczną lub chemiczną, stratyfikację ciepłą, zimą lub mieszaną. Jednak rozwój metod naukowych, w tym biologii molekularnej, pozwala i stymuluje do bardziej precyzyjnego określenia podstaw tego zjawiska, a co za tym idzie daje możliwość do zastosowania subtelniejszych metod kontrolowania mechanizmów dormancji, czyli uśpienia nasion.

**Oceniana dysertacja doktorska wpisuje się w nurt molekularnych badań związanych ze zjawiskiem kontroli kiełkowania spoczynkowych nasion jabłoni.** Podjęto próbę wskazania mechanizmów oddziaływania tlenu azotu (NO) – lotnej, więc trudnej do bezpośredniego badania, cząstki sygnałowej – w kontekście ustępowania spoczynku nasion i wzrostu zarodków jabłoni. Autorka weryfikowała, czy stymulacja wzrostu spoczynkowych zarodków jabłoni po ekspozycji na NO jest związana ze zmianami ekspresji genów kodujących: (i) enzymy szlaków biosyntezy lub degradacji fitohormonów uznanych za kluczowe dla kiełkowania nasion tj. kwasu abscysynowego (ABA), giberelin (GA), kwasu jasmonowego (JA) oraz elementy szlaków transdukcji sygnałów ww. hormonów, (ii) enzymy syntezy reaktywnych form tlenu (RFT), przy założeniu, że RFT mogą być wtórnymi przekaźnikami sygnału NO, a także (iii) analizowała po-translacyjne modyfikacje białek generowane przez reaktywne formy azotu (RFA)- w tym NO – z próbą identyfikacji zmienionych – S-nitrozylowanych – białek.

Biorąc zatem powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że **podjęto badania biologii nasion na poziomie transkryptomycznym i proteomicznym, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.**

## 2. Uwagi formalne

**Forma rozprawy spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim.** Praca liczy 170 stron formatu A4. Opatrzona jest tytułem i streszczeniem w języku polskim oraz angielskim, co czyni temat rozprawy dostępnym także dla szerszej rzeszy czytelników. Poza zasadniczą treścią zawiera: stosowne oświadczenia, podziękowania, spis treści oraz spisy tabel, rysunków i zdjęć, wykaz „*najważniejszych skrótów*” – do którego odnoszę się w uwagach szczegółowych – a także zgodę Autorki na udostępnianie pracy.

Zasadnicza treść została podzielona na siedem rozdziałów: przegląd literatury – stanowiący wstęp do podjętego tematu, cel pracy, materiał doświadczalny i metody badawcze, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz literaturę.

**Przegląd literatury** jest teoretycznym wprowadzeniem prezentującym aktualny stan wiedzy w temacie dojrzewania nasion, ich spoczynku i kiełkowania z uwzględnieniem roli kluczowych dla tych procesów fitohormonów (ABA, GA, JA) oraz RFT i NO. Wstęp jest napisany jasno i spójnie logicznie. Szeroki zakres cytowanych prac świadczy o dobrej znajomości literatury. Mam jednak kilka uwag dotyczących tej części.

Tytuł rozdziału 1.1. „*Embriogeneza nasion*” jest, po pierwsze, niepoprawny – gdyż embriogeneza dotyczy zarodka, dla nasion sugerowałabym termin dojrzewanie; a po drugie, nieadekwatny do treści – ponieważ Autorka opisuje w nim krótko budowę nasion. Ponadto, funkcję zapasową w nasionach nie zawsze pełni bielmo (jak sugeruje się na str. 30) – np. u jabłoni są to liście – i nie zawsze cukrowce są głównymi związkami zapasowymi (patrz nasiona oleiste i białkowe).

W związku z faktem, że termin embriogeneza w stosunku do całych nasion pojawia się również na rysunku 1 (str. 31), chciałabym aby Autorka podczas publicznej obrony wytłumaczyła powód zastosowania tego niefortunnego skrótu myślowego, **opisując poprawnie kolejne fazy dojrzewania nasion, ze wskazaniem momentów inicjowania różnych typów spoczynku.** Nadto, jeśli na rysunku 3 (str. 34) – dotyczącym kiełkowania – intensywność składowych procesów w czasie jest wyrażona i proporcjonalna do intensywności zabarwienia wzdłuż danej strzałki, to **w przypadku „katabolizmu związków zapasowych” mamy poważne nieścisłości – proszę o ich wyjaśnienie.** Zabrakło mi również bezpośredniego **wyjaśnienia terminu nasiona *ortodox*** (str. 36) i ***recalcitrant*.**

Mimo przedstawionych zastrzeżeń względem tej części pracy, które traktuję jako przyczynek do dyskusji z Autorką, jestem pod wrażeniem syntetycznego ujęcia przez Panią mgr Andrykę-Dudek bardzo rozległej tematyki fitohormonalnej regulacji spoczynku i kiełkowania nasion z uwzględnieniem dobrze już opisanej w literaturze biosyntezy i sygnalizacji RFT oraz aktualnie intensywnie eksplorowanej sygnalizacji RFA – w szczególności NO. Bardzo pomocne w tym względzie były zastosowane schematy (13), tabele (2) i zdjęcie wybranego materiału doświadczalnego – izolowanych zarodków jabłoni. Wstęp współgra z wytyczonym na str. 71 **celem pracy.**

Część **materiał doświadczalny i metody badawcze** tradycyjnie zawiera dane na temat materiału roślinnego, warunków i schematu doświadczeń oraz zastosowanych metod i technik molekularnych, które w omawianym przypadku zostały właściwie dobrane i opisane oraz umożliwiły analizę postawionych zadań/problemów.

W rozdziale **wyniki** zawarta jest dokumentacja prowadzonych doświadczeń w postaci fotografii obrazującej badane kultury spoczynkowych zarodków jabłoni; następnie 20-tu grup wykresów dotyczących ekspresji względnej wybranych genów (szacowano poziom transkryptów genów z wykorzystaniem półilościowego RT-qPCR) w określonych warunkach doświadczalnych; a także 4 tabel i 2 grup diagramów Venna przedstawiających efekty badań proteomicznych, w szczególności charakteryzujących białka S-nitrozylowane pojawiające się w określonych warunkach doświadczalnych.

Autorka zbadała względną aktywność 35 genów w następujących grupach:

- geny kodujące enzymy biosyntezy ABA: *NCED1*, *NCED3* oraz katabolizmu ABA: *CYP707A1*, *CYP707A2*;
- geny kodujące receptory szlaku transdukcji sygnału ABA: *PYL1*, *RCAR1*, *RCAR3* oraz gen *DOG* - uznawany za marker spoczynku nasion;

- geny kodujące białka szlaku transdukcji sygnału ABA: *ABI1*, *ABI2*, *PP2C*, *SnRK2*, *ABF*, *ABI5*, *AREB3*;
- geny kodujące enzymy biosyntezy GA: *GA20ox*, *GA3ox* oraz degradacji GA: *GA2ox*;
- geny kodujące białka szlaku transdukcji sygnału GA: *GID1*, *GID2*, *DELLA* oraz *SLP2* mitochondrialną fosfatazę białkową — regulator aktywności GA związany z kiełkowaniem;
- geny kodujące enzymy biosyntezy JA: *AOS*, *JAR1*, *JMT*;
- geny kodujące białka szlaku transdukcji sygnału JA: *COI*, *JAZ3*, *JAZ12*, *MYC2*;
- geny kodujące enzymy biosyntezy ROS: *AO1*, *POX*, *RBOH*;
- geny kodujące elementy szlaku transdukcji sygnału ROS: *CaM*, *MAPK*, *PTP*.

Badania transkryptomu i proteomu Doktorantka prowadziła w osiach wyizolowanych z zarodków jabłoni krótkotrwale traktowanych NO po 3 i 96 h prowadzenia kultury od momentu traktowania NO i kontrolnych – nietraktowanych NO – odpowiednio po 3 i 96 h oraz z zarodków poddanych imbibicji ( $K_0$ ), a także – dla porównania efektów różnych zabiegów przełamywania spoczynku – w osiach wyizolowanych z nasion jabłoni poddanych chłodnej stratyfikacji po 1, 14, 40, 90 dniach od momentu rozpoczęcia tego zabiegu, a także po 90 dniach chłodnej stratyfikacji i jednym dniem prowadzenia kultury zarodków wyizolowanych z tych nasion (90+1) – co w efekcie dostarczyło ogromną ilość danych do analiz różnicowych.

Wśród osiągnięć mgr Andryki-Dudek na podkreślenie zasługuje wykazanie że: (i) molekularne mechanizmy działające w osiach zarodkowych jabłoni, których spoczynek ustępuje w czasie chłodnej stratyfikacji i mechanizmy molekularne w osiach zarodków których spoczynek jest przerywany NO na poziomie transkryptomu wykazują liczne podobieństwa wynikające prawdopodobnie z endogennej emisji NO w nasionach w początkowych etapach stratyfikacji chłodnej, lecz nie są one identyczne; (ii) brak zmian lub niewielkie zmiany ekspresji niektórych genów w czasie ustępowania spoczynku nasion lub zarodków mogą być rekompensowane przez regulacje na kolejnym poziomie tj. przez po-translacyjne modyfikacje produktów białkowych tych genów, w tym S-nitrozylację białek np. RBOH lub CaM; (iii) białka podlegające S-nitrozylacji tylko w czasie ustępowania spoczynku podczas stratyfikacji: LOX i SnRK2 wskazują, że w czasie stratyfikacji w chłodzie dużą rolę może odgrywać uruchamianie materiałów zapasowych i ścieżka sygnałowa ABA; oraz (iv) w procesie wzrostu korzenia zarodkowego uruchamiane są inne ścieżki metaboliczne niż te, które decydują o ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion.

Osiągnięcia te pogłębiają wiedzę o fizjologii spoczynkowych nasion jabłoni, pozwalając na lepsze zrozumienie mechanizmów ustępowania spoczynku, kiełkowania i rozwoju młodej siewki, jednocześnie wskazując, że metoda przełamywania spoczynku nasion traktowaniem NO jest szybsza, wygodniejsza, a równie skuteczna i jej mechanizmy na poziomie molekularnym są podobne do naturalnie występujących podczas stratyfikacji zimą.

W rozdziale **dyskusja** (liczącym 29 stron) Doktorantka omawia otrzymane wyniki na tle badań innych autorów. Uważam, że ten rozdział jest dobrze napisany, dyskusja nie była łatwa, a jest zajmująca – percepcję dużej ilości danych ułatwiają 4 tabele podsumowujące i porównujące badania ekspresji genów w poszczególnych grupach i wariantach doświadczalnych. Autorka zacytowała liczne aktualne prace, jak i opracowania starsze, które są jednak „klasyką” dla biologii nasion. W krótkim, 3-stronicowym rozdziale **podsumowanie i wnioski**, Doktorantka wypunktowała swoje najistotniejsze spostrzeżenia.

Bardzo obszerna **literatura**, obejmująca 407 pozycji, odzwierciedla szerokie zapoznanie się Doktorantki z eksplorowaną dziedziną badań. Blisko połowa cytowanych prac (43%), to publikacje z ostatniego dziesięciolecia.

### 3. Uwagi szczegółowe

Recenzowana rozprawa ze względów merytorycznych zasługuje na dobrą ocenę, napisana jest w zasadzie poprawnym językiem z przejrzystą dokumentacją. Jednakże Autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów, niezręczności językowych i drobnych potknięć redakcyjnych. Przytaczam je poniżej tytułem przykładu, czasem w celu wyjaśnienia, a nade wszystko z obowiązku recenzenta.

- Str. 27-29 – w mojej opinii system doboru nielicznych skrótów, które znalazły się w części „Wykaz najważniejszych skrótów stosowanych w tekście” jest niejasny, a w zasadzie przypadkowy. W tego typu pracy, gdzie stosuje się mnóstwo akronimów genów i białek wykaz skrótów powinien zawierać je wszystkie z rozwinięciami, gdyż to znacznie ułatwiłoby czytelnikowi korzystanie z pracy. Tu niestety tego zabrakło.
- Str. 30 – funkcją okrywy nasiennej jest regulacja wymiany gazowej i pobierania wody, a nie „ograniczanie” ich.
- Str. 36 – **proszę o wyjaśnienie/uzasadnienie użycia terminu niedojrzałość fizjologiczna w zdaniu:** „Jesienią nasiona zapadają w stan spoczynku bezwzględnego ze względu na niedojrzałość fizjologiczną wynikającą z nagromadzenia w tkankach okrywających, jak i w zarodku inhibitorów wzrostu w tym związków fenolowych i ABA”.
- Str. 38 – cząsteczki sygnałowe nie „mogą pełnić”, a pełnią rolę w transdukcji sygnału.
- Str. 40 – w tekście, przy omawianiu schematu z rysunku 4 jest zdanie: „Białka PP2C z kładu A aktywują kolejny elementu szlaku – kinazę białkową podobną do SNF1 (SnRK2, ang. SNF1-related protein kinases 2)” – a faktycznie białka te blokują/hamują aktywność rzeczony kinazy i dopiero kompleks ABA z PYR/PYL/RCAR blokując fosfatazy PP2C uwalnia kinazy spod ich kontroli – co prawidłowo zostało przedstawione na rysunku 4 i w opisie pod nim (str. 39).
- Str. 49 – w zdaniu: „Akumulacja ROS, szczególnie •OH...” – termin akumulacja w stosunku do tak krótko-żyjącej cząsteczki jak rodnik hydroksylowy, jest mało adekwatny.
- Str. 55 – z uwagi na zdanie: „Zasugerowano, że tak zmodyfikowane białka ulegają cytozolowej proteolizie poprzez proteasom 20S, co prowadzi do mobilizacji białek zapasowych, a następnie do uwolnienia aminokwasów, które mogą być wykorzystane ponownie do syntezy białek de novo (Oracz i Stawska 2016)” – które wydaje się dotyczyć różnych wcześniej wymienianych karbonylowanych białek, **proszę o precyzyjne wyjaśnienie ich związku z mobilizacją rezerw białkowych (?)**.
- Str. 55/56 – Autorka najpierw opisuje oksydacyjne uszkodzenia mRNA jako przyczynę zahamowania biosyntezy białek (przerwanie translacji), a następnie na str. 56 umieszcza zdanie: „Pojawianie się kolejnych białek niezbędnych w procesie ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion może być wynikiem selektywnego utleniania transkryptomu” – **proszę o wyjaśnienie tego fenomenu**.
- Str. 57 – pojawia się skrót PTMs, a jego rozwinięcie mamy dopiero na str. 62.
- Str. 58/59 – niestety pomyłone są akronimy i umiejscowienie reduktaz azotowych V (azotanowej) i III (azotynowej). NR, to faktycznie reduktaza azotanowa kodowana przez *NIA1* oraz *NIA2* ale indukowana przez wysokie stężenia substratu – NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a nie NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Natomiast produkt jej aktywności – NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, jest dalej redukowany do amoniaku przez NiR – reduktazę azotynową zlokalizowaną w plastydach – gdzie nie ma NR. Zaś Ni-NOR, to plazmolemowa reduktaza azotyn-tlenek azotu.
- Str. 59 – pojawia się skrót sCG, który nigdzie nie jest rozwinięty – ang. *soluble guanylate cyclase*.
- Str. 65 – jestem zdecydowaną przeciwniczką stosowania terminu „odpowiedź immunologiczna rośliny”.
- Str. 71 – jest napisane „... podczas ustępowania spoczynku i **kiełkowania zarodków** jabłoni” – a zgodnie z definicją to nasiona kiełkują, natomiast zarodki jabłoni rozwijają się bądź rosną. Niestety w pracy kilkakrotnie użyty był termin kiełkowanie/skiełkowane w stosunku do zarodków.
- Str. 73 – literówka – brak s w słowie spoczynkowych (9 wers).
- Str. 75 – zastosowano żargon laboratoryjny „DNazowanie”.
- Str. 75, 76, 80, 81, 82, 84 – skrót „min” powinien być zakończony kropką.
- Str. 111 – jest „Tabela 6 przedstawia listę 20 białek...” - powinno być Tabela 7.

Spis literatury nie jest bezbłędny, np. w: Askew *et al.* 1995 – brak tytułu pracy; Baker & Graham 2002 – brak stron; Cantoro *et al.* 2013, Fan *et al.* 2007, Halliwell 2006, Ishibashi *et al.* 2012 – brak wielkich liter w skrótach

nazw czasopism; Nishimura *et all.* 2018 – zastosowano same wielkie litery w niewymagającym tego skrócie nazwy czasopisma; Lewak 2007 - brak stron rozdziału i pełnych danych monografii z której pochodzi. Ponadto, system zapisu danych bibliograficznych nie jest jednolity. Autorka niekiedy stosowała pełne nazwy czasopism innym razem skróty – bywało, że niezgodne z oficjalnie przyjętymi np.: „APP” (str. 161) – zamiast Acta Physiol Plant; „PGR” (str. 153, 159, 161,162, 169, 169) – zamiast Plant Growth Regul; „Phys. Plantarum”(str. 156, 158) – zamiast Physiol Plant; „Plant Phys.” (str. 156, 160, 162, 163) – zamiast Plant Physiol; „NSAPCC” (str. 157) – zamiast N-S Arch Parmacol; „Tree Phys.”(str. 159) – zamiast Tree Physiol; „PPB” (str. 160, 165) – zamiast Plant Physiol Biochem; „Acta Phys. Plant” (str. 161) – zamiast Acta Physiol Plant; „PLANT 683 Physiol.” (str. 162) – zamiast Plant Physiol; „Plant Species Biol.” (str. 163) – zamiast Plant Spec Biol; „Front. in Plant Sci.” (str. 168) – zamiast Front Plant Sci.

#### 4. Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Uważam, że jest ona dobrym opracowaniem naukowym oraz wnosi nowe odkrycia pozwalające lepiej poznać skomplikowany mechanizm ustępowania spoczynku w nasionach jabłoni. Część eksperymentalna została prawidłowo zaplanowana i metodycznie odpowiednio wykonana. Godna podkreślenia jest ogromna ilość wykonanych analiz oraz wysokospecjalistyczny warsztat metodyczny tj. zastosowanie nowoczesnych metod biologii molekularnej podczas realizacji zadań badawczych. Postawione przez Doktorantkę cele zostały zrealizowane.

Pomimo pewnych uwag krytycznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, niniejszym stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. **„Molekularny mechanizm działania tlenu azotu, w podejściu transkryptomicznym i proteomicznym, podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion jabłoni”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i określone w stosownych przepisach ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z powyższym, **wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie jej Autorki – mgr Pauliny A. Andryki-Dudek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Prof. dr hab. Małgorzata M. Posmyk