



Prof. dr hab. Iwona Ciereszko  
Pracownia Fizjologii Roślin  
Katedra Biologii i Ekologii Roślin  
Wydział Biologii  
Uniwersytet w Białymstoku

Białystok, 12.02.2024 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Wojtaczki pt. „**Wpływ indolilo-3-acetylo-asparagianu na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny**”

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Wojtaczki została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Macieja Ostrowskiego, prof. UMK w Katedrze Biochemii Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Praca ta jest kontynuacją tematyki naukowej realizowanej przez Pana Promotora. Doktorantka, wykorzystując nowoczesne techniki badawcze, przeprowadziła interesujące analizy biochemiczne siewek grochu rosnących w warunkach różnego *osmoticum* - starając się wyjaśnić rolę i mechanizm działania amidowego koniugatu auksyny w zastosowanym układzie eksperymentalnym.

Rozprawa doktorska mgr P. Wojtaczki ma układ typowy dla pracy eksperymentalnej, obejmuje 110 stron wydruku, zawiera odpowiedni Spis treści i Wykaz stosowanych skrótów oraz rozdziały: Wstęp (23 strony), Cel pracy (1,5 strony), Materiały i metody (17 stron), Wyniki (25 stron), Dyskusja (14 stron) i Podsumowanie. Rozprawa doktorska jest opracowaniem napisanym w języku polskim, zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy umieszczono spis 178 pozycji cytowanego piśmiennictwa.

Wstęp rozprawy doktorskiej jest dobrze opracowanym rozdziałem, który został podzielony na dwie główne części tematyczne. Doktorantka scharakteryzowała, w pierwszej kolejności, auksyny i ich biosyntezę w tkankach roślin, następnie zaprezentowała różnorodne koniugaty estrowe i amidowe auksyn oraz przedstawiła ich znaczenie. Szczegółowo omówiła zwłaszcza indolilo-3-acetylo-asparagian (IAA-Asp), jeden z koniugatów amidowych dominujących w tkankach roślin dwuliściennych (także u grochu). Scharakteryzowała amidosyntetazy GH3 - enzymy zaangażowane w biosyntezę koniugatów auksyn - ich rolę oraz kodujące je geny. Omówiła ponadto badania prowadzące do poznania mechanizmu syntezy koniugatów amidowych. Przeanalizowała dostępne dane dotyczące oddziaływania stresowych czynników abiotycznych i biotycznych na syntezę koniugatów auksyn oraz aktywność/regulację enzymów GH3. Doktorantka w kolejnej części Wstępu przedstawiła definicję stresu oksydacyjnego, opisała pokrótce

przedstawiciele reaktywnych form tlenu (RFT) i miejsca ich generowania w komórkach roślinnych, a także zaprezentowała skutki nadmiaru RFT prowadzące do uszkodzeń błon komórkowych i materiału genetycznego. Doktorantka szczegółowo scharakteryzowała modyfikacje białek zachodzące wskutek stresu oksydacyjnego, zarówno nieodwracalne, jak karbonylacja oraz odwracalne, jak S-nitrozylacja i S-glutationylacja. Ostatnia część Wstępu to prezentacja aspektów związanych z obroną roślin przed stresem oksydacyjnym, w której skrótowo omówiła składniki systemu antyoksydacyjnego: enzymatycznego i nieenzymatycznego u roślin. Uważam, że zaprezentowane we Wstępie informacje w pełni wprowadzają w tematykę naukowych zainteresowań Doktorantki. Omawiane treści zostały zobrazowane schematami - rozdział zawiera jedenaście przydatnych rycin (nie ma natomiast tabel). Generalnie nie mam uwag krytycznych do tego rozdziału pracy doktorskiej. Nasuwa się tylko sugestia, iż warto cytować prace przeglądowe polskich grup badawczych związane z omawianą tematyką, np. prace opublikowane w czasopiśmie *Postępy Biochemii*: 2012, 58(1):34; 2015, 61(2):191; 2016, 62(4):495. Stwierdzam, że Wstęp rozprawy doktorskiej trafnie uwzględnia najważniejsze dane, zawiera zasób informacji wystarczający do dalszego śledzenia wyników pracy i ich interpretacji. Zwraca uwagę znajomość specjalistycznej literatury z tematyki związanej z rozprawą doktorską, cytowane piśmiennictwo to w większości angielskojęzyczne prace oryginalne, ponadto wiele cytowanych pozycji opublikowano w ciągu ostatnich kilku lat.

Cel recenzowanej rozprawy doktorskiej został określony, jest nim poznanie udziału koniugatu indolilo-3-acetylo-asparaginianu (IAA-Asp) w odpowiedzi grochu na niekorzystne warunki środowiskowe (stres/szok osmotyczny). Cele szczegółowe zostały sprecyzowane jako: i) poznanie wpływu IAA-Asp na poziom i aktywność wybranych składników systemu antyoksydacyjnego oraz modyfikacje białek w siewkach traktowanych chlorkiem sodu lub glikolem polietylenowym (PEG); ii) określenie czy egzogenny koniugat IAA-Asp moduluje poziom fitohormonów w tkankach; iii) zbadanie czy IAA-Asp zmienia aktywność enzymów zaangażowanych w proces koniugacji auksyny. Postawiono także pytanie, czy koniugat IAA-Asp może funkcjonować jak cząsteczka biologicznie aktywna, niezależnie od poziomu wolnej auksyny. Analizując rozprawę doktorską i uzyskane wyniki badań, można stwierdzić, że cele pracy zostały zrealizowane.

Metodyka badawcza i doświadczalny materiał roślinny stosowany w pracy doktorskiej zostały odpowiednio dobrane do realizacji założonych celów i nie budzą zastrzeżeń. Rozdział Materiał i Metody został podzielony na szereg podrozdziałów, które opisują pokrótce materiał roślinny, prezentują spis używanych zestawów odczynników, przedstawiają analizy biochemiczne i instrumentalne. Rozdział ten zawiera szczegółowe informacje o zastosowanych metodach i technikach. Doktorantka w badaniach wykorzystwała siewki grochu siewnego (*Pisum sativum* L.) rosnące około tygodnia w warunkach ciemności (etiologowane). W jednym wariantcie eksperymentalnym do kultur podawano 200  $\mu$ M IAA-Asp i/lub 150 mM chlorku sodu (NaCl) i inkubowano przez 3 godziny, natomiast w drugim wariantcie siewki traktowano 20% glikolem polietylenowym (PEG 6000) i inkubowano dwie doby, w temperaturze pokojowej.



Doktorantka wykonała szereg oznaczeń spektrofotometrycznych, zastosowała techniki chromatograficzne i spektrometrii mas (LC-MS/MS). Oznaczała spektrofotometrycznie metabolity i wybrane antyoksydanty oraz aktywności białek enzymatycznych, w przypadku niektórych oznaczeń stosowała mikropłytkowy spektrofotometr. Wykorzystała również analizy elektroforetyczne i immunodetekcję białek: metodę elektroforezy natywnej (native-PAGE) zastosowała w przypadku badania aktywności izoform enzymów (reduktazy glutationowej, peroksydazy i S-transferazy glutationowej) a poziom S-glutationyloowanych białek określiła metodą Western blotting. Elektroforezę dwukierunkową (2-D) zastosowano do oznaczeń karbonylowanych białek. Doktorantka opisała także analizy izotopowe, np. przydatne do oznaczenia aktywności enzymów amidosyntetazy IAA-Asp i syntazy IAGlc. Zastosowała także technikę RT-qPCR w przypadku badania ekspresji *PsGH3*, genu kodującego amidosyntetazę IAA-Asp. Do oznaczeń poziomu koniugatu IAA-Asp i wybranych fitohormonów w pędach siewek grochu wykorzystano natomiast metody z użyciem LC-MS/MS. Doktorantka szczegółowo opisywała metody oznaczeń, co wskazuje na samodzielne przeprowadzenie większości doświadczeń. Niektóre badania, np. identyfikacja białek metodą spektrometrii mas (MALDI-TOF) zostały wykonane dzięki współpracy z wyspecjalizowaną zagraniczną jednostką naukową (Uniwersytet w Poczdamie, Niemcy). Uważam, że zastosowany w pracy doktorskiej układ eksperymentalny, metody badań i materiał roślinny zostały właściwie opisane i dobrane do realizacji celów badawczych. Szeroki zakres użytych metod i nowoczesnych technik badawczych jest niewątpliwym atutem ocenianej rozprawy doktorskiej. Nasuwają się jednak pewne uwagi do tego rozdziału: i) w niektórych miejscach zabrakło odnośników do literatury metodycznej (np. podrozdział 2.2 str. 41, 2.9 str. 51, 52); ii) analizy statystyczne powinny być szerzej opisane; iii) nie podano, czy siewki podlewano pożywką mineralną; iv) nie opisano analiz parametrów wzrostowych siewek. Uważam, że należałoby uwzględnić opis wstępnych badań dotyczących testowania stężeń podawanych związków i czasu ich podawania. Przegląd omawianego rozdziału, łącznie z wynikami prezentowanymi w następnej części rozprawy doktorskiej, pozwala jednak stwierdzić, że mgr P. Wojtaczka opanowała aktualne metody badawcze biochemii i biologii eksperymentalnej roślin i zastosowała w pracy własnej.

Rozdział opisujący wyniki badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej został podzielony na dziesięć podrozdziałów i zawiera łącznie 19 rycin i dwie tabele. Doktorantka rozpoczęła opis od przedstawienia hydrolizy koniugatu IAA-Asp w pędach grochu (w postaci chromatogramów z LC-MS/MS). Zaprezentowała zmiany zawartości proliny po inkubacji z PEG oraz askorbinianu, po oddziaływaniu IAA-Asp i/lub PEG. Doktorantka przeprowadziła analizę poziomu stresu oksydacyjnego po traktowaniu koniugatem IAA-Asp i/lub PEG – prezentując wzrost zawartości aldehydu malonowego (MDA) i metyloglioksalu (efekt zmian w peroksydacji lipidów); wyniki po inkubacji z NaCl nie były natomiast prezentowane. W kolejnym etapie scharakteryzowała wpływ koniugatu IAA-Asp i szoku osmotycznego na stosunek glutationu zredukowanego do glutationu utlenionego (GH/GSSG) oraz zawartość grup tiolowych (stosunek zawartości -SH w białkach do całkowitej zawartości -SH w tkance).



Doktorantka w następnej części zaprezentowała wyniki analiz oddziaływania koniugatu IAA-Asp i szoku osmotycznego na aktywności enzymów (i ich izoform) uczestniczących w metabolizmie glutationu. Przedstawiła także wyniki dotyczące S-glutationylacji białek w tych warunkach. Kolejną badaną modyfikacją była karbonylacja białek w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp i/lub NaCl i PEG. Doktorantka zaprezentowała także zawartość niektórych fitohormonów (jasmonian, kwas salicylowy i kwas absycynowy) oraz ich zmiany pod wpływem IAA-Asp i szoku osmotycznego. Ostatnie ryciny w rozdziale Wyniki przedstawiają oddziaływania IAA-Asp i *osmoticum* na poziom koniugatu i zawartość wolnej auksyny a także ekspresję genu i aktywność enzymu amidosyntetazy IAA-Asp oraz aktywność glukozylotransferazy IAA (syntazy IAGlc). Uzyskane wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej. Należy stwierdzić, że opis wyników badań w ocenianej rozprawie doktorskiej jest poprawny, logiczny, po fragmentach omówienia wyników cytowane są właściwe ryciny (lub tabele), opatrzone odpowiednimi opisami a prezentowane wykresy są w większości czytelne i możliwe do porównania (za wyjątkiem Ryc. 19 B, D i Ryc. 20 B). Doktorantka w wyniku pracy eksperymentalnej uzyskała szereg ciekawych i nowych wyników. Do interesujących wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej należy zaliczyć wykazanie, że: i) koniugat IAA-Asp prawdopodobnie nie jest źródłem wolnej auksyny w pędach siewek grochu, nie wpływa też istotnie na poziom badanych symptomów stresu oksydacyjnego w zastosowanych warunkach eksperymentalnych; ii) stres osmotyczny (wywołany traktowaniem siewek grochu NaCl lub PEG) oraz egzogeny IAA-Asp oddziałują na aktywność enzymów regulujących poziom glutationu oraz S-glutationylację białek; iii) obecność egzogenego koniugatu IAA-Asp wpływa na poziom hormonów ABA, SA i JA a nie wpływa na poziom auksyny; iv) egzogeny IAA-Asp oddziałuje na ekspresję genu i aktywność enzymu amidosyntetazy IAA-Asp oraz aktywność syntazy IAGlc, także po traktowaniu PEG. Uzyskane wyniki badań sugerują regulacyjną funkcję badanego koniugatu IAA-Asp, niezależnie od poziomu wolnej auksyny. Po analizie rozdziału prezentującego wyniki eksperymentów mogę stwierdzić, iż sposób przedstawienia i opis wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej jest prawidłowy. Nasuwa się jednak kilka sugestii – należy żałować, że nie oznaczono zawartości wody w tkankach (lub wskaźnika RWC), gdyż w warunkach stresu osmotycznego (lub zasolenia) można oczekiwać zmian w uwodnieniu tkanki. Uważam, iż brakuje podstawowych danych dotyczących kiełkowania i wzrostu siewek grochu w stosowanych warunkach eksperymentalnych.

Dyskusja jest obszernym rozdziałem rozprawy doktorskiej, w którym trafnie analizowano wyniki badań własnych i porównano z danymi opublikowanymi przez inne grupy badawcze. Doktorantka omówiła m.in. wpływ koniugatu IAA-Asp na reakcje siewek na szok osmotyczny, modyfikacje poziomu antyoksydantów, objawy stresu osmotycznego, czy statusu tiolowego i karbonylacji białek. Następne przedyskutowane zostały możliwe oddziaływania koniugatów auksynowych na poziom innych fitohormonów w tkankach roślin. Ostatnia część Dyskusji poświęcona została aspektom oddziaływań IAA-Asp na procesy warunkujące homeostazę auksynową w komórkach siewek grochu. Na podstawie



uzyskanych wyników sformułowano podsumowanie, będące logicznym następstwem przeprowadzonych badań. Zaprezentowane i dyskutowane wyniki badań przyczyniają się niewątpliwie do poszerzenia wiedzy o podstawach i mechanizmach oddziaływania koniugatów fitohormonów i szoku osmotycznego we wczesnych etapach wzrostu roślin bobowatych. Można uznać, iż oceniana rozprawa doktorska wpisuje się we współczesne rozważania dotyczące możliwości odpowiedzi roślin użytkowych na warunki stresowe oddziałujące na ich kondycję i procesy metaboliczne. Nie nasuwa się wiele uwag dotyczących rozdziału Dyskusja w ocenianej rozprawie. Prezentowane wyniki własne nie znikają na tle danych literaturowych i są podkreślone w odpowiednim stopniu (choć warto czasami cytować własne ryciny). Żałuję jednak, iż zabrakło schematu lub tabeli z podsumowaniem uzyskanych wyników, co ułatwiłoby powiązanie poszczególnych wątków pracy. Uważam, iż wstępna część rozdziału Dyskusja powinna być zmieniona - podstawowe dane o grochu jako roślinie użytkowej pasują raczej do wcześniejszych części pracy, także zakończenie i ostatnie zdania pozostawiają pewien niedosyt - należałoby ten aspekt rozwinąć. W ocenianej pracy badano etiolowane pędy siewek, nie znalazłam wyjaśnienia dlaczego wybrano taki materiał i czy rozważano oznaczenia w innych tkankach? Chciałabym, aby Doktorantka wyjaśniła decyzję wyboru stężeń NaCl i PEG oraz różnego czasu ich oddziaływania na siewki oraz dlaczego używa w obu przypadkach określenia „szok osmotyczny”. Czy zasolenie może być przyczyną obserwowanych zmian? Czy po podaniu stosowanych stężeń związków obserwowano symptomy stresu wodnego w tkankach? Interesuje mnie także, czy Doktorantka rozważała zbadanie poziomu innych koniugatów auksyn, estrowych, obserwowano bowiem wyraźny wzrost aktywności enzymu glukozylotransferazy IAA (syntazy IAGlc). Czy takie badania były już wykonywane przez innych badaczy w zbliżonych warunkach? Myślę, iż warto uzupełnić dyskusję o te aspekty, w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Należy jednak stwierdzić, iż problematyka badawcza z zakresu zainteresowań została opanowana. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością tematyki i terminologii naukowej, potrafiła właściwie zinterpretować wyniki własnych eksperymentów i umiejętnie analizować opublikowane prace innych badaczy. W niektórych fragmentach Dyskusji starała się także krytycznie ustosunkować do wyników badań własnych, jest to ważne w pracy naukowej; o doświadczeniu jako badacza, świadczą również opublikowane prace, w których mgr Patrycja Wojtaczka jest współautorką oraz udział w konferencjach naukowych. Oczekuję, że na obronie rozprawy doktorskiej, oprócz odpowiedzi na wcześniejsze pytania, wskazane zostaną badania, które warto kontynuować i uzupełnić w przyszłości.

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Wojtaczki jest napisana poprawnym językiem naukowym, bez większych błędów. Praca jest odpowiednio zredagowana, prawidłowo cytowane są publikacje naukowe innych autorów a spis literatury jest ujednolicony. Uważam, iż przedstawiona do recenzji praca jest estetyczną i staranną rozprawą doktorską, którą generalnie czyta się z przyjemnością. Znalaziono jednak pewne niedociągnięcia, np. nietypowa numeracja rozdziałów i podrozdziałów (np. podrozdział 2.3 może

być cytowany jako podrozdział obecny w Metodach i Dyskusji, co jest mylące). Można zauważyć pewne „niezręczności językowe”, np. często używany w Podsumowaniu zwrot – cyt. „w siewkach grochu nienarażonych na działanie warunków stresowych” (str. 95) raczej powinien być zamieniony na „warunki kontrolne”, zwłaszcza że wzrost siewek odbywał się w ciemności (str. 38), a brak/niedobór światła zaliczany jest do czynników stresowych. W tekście rozprawy doktorskiej stwierdzono nieliczne drobne błędy literowe lub interpunkcyjne (np. na stronach: 13, 15, 19, 39, 50, 53, 96, 97, 100, 105, 109, 110). Spis literatury składający się z 15 stron jest odpowiednio ujednolicony i należy go uznać za starannie opracowany fragment pracy doktorskiej. Wymienione nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy doktorskiej.

### **Wniosek końcowy**

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Wojtaczki mieści się w zakresie dyscypliny nauki biologiczne (dziedzina nauk ścisłych i przyrodniczych), jest aktualna naukowo, wymagała samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i zawiera oryginalne rozwiązania problemów badawczych. Stwierdzam, iż oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r., z późniejszymi zmianami). Doktorantka zrealizowała cele postawione w pracy, opanowała współczesne metody badawcze, uzyskane wyniki są oryginalne a praca została napisana ze znajomością wiedzy teoretycznej w dyscyplinie naukowej. Stwierdzam więc, jako recenzent, że praca doktorska mgr Patrycji Wojtaczki zatytułowana: „Wpływ indolilo-3-acetylo-asparagianinu na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Występuję zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Wojtaczki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Białystok, 12.02.2024 r.



Prof. dr hab. Iwona Ciereszko  
Katedra Biologii i Ekologii Roślin  
Wydział Biologii UwB