



# INSTYTUT DENDROLOGII

## POLSKIEJ AKADEMII NAUK

62-035 KÓRNIK, ul. Parkowa 5  
e-mail: idkornik@man.poznan.pl

tel. 61 817 00 33, fax 61 817 01 66  
www.idpan.poznan.pl

dr hab. Tomasz Pawłowski, prof. ID PAN

Kórnik, 14.03.2019

### **Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Marleny Stawskiej**

**Tytuł rozprawy: Rola wybranych elementów szlaku sygnałowego światła w regulacji kiełkowania nasion *Arabidopsis thaliana***

**Promotor: prof. dr hab. Sławomir Podlaski**

**Promotor pomocniczy: dr Krystyna Oracz**

**Katedra Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego**

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Marleny Stawskiej było poznanie roli wybranych elementów sygnałowego szlaku świetlnego i określenie nowych interakcji w sieci oddziaływań światła z czynnikami wewnętrznymi (kwas abscysynowy, gibereliny i reaktywne formy tlenu) w kiełkujących nasionach *Arabidopsis thaliana*. W poszukiwaniu odpowiedzi na postawione pytania badawcze zastosowano różnorodne metody badawcze. Wykorzystując jako materiał nasiona *A. thaliana* typu dzikiego, mutantów insercyjnych i transformantów, zbadano rolę wybranych receptorów i czynników transkrypcyjnych regulujących odpowiedź roślin na światło. Uzyskane nowatorskie wyniki pozwoliły na: lepsze zrozumienie roli światła niebieskiego w procesach zachodzących w nasionach, scharakteryzowanie funkcji ROS w regulacji badanego procesu, oraz określenie nowych, potencjalnych interakcji pomiędzy szlakiem sygnałowym światła a metabolizmem i transdukcją sygnałów indukowanych przez ABA, GA i ROS w zależnym od światła kiełkowaniu nasion. Wykonane badania w znaczącym stopniu wpłynęły na poszerzenie wiedzy o mechanizmach regulujących kiełkowanie nasion pod wpływem światła. Z tych względów tematykę rozprawy mgr inż. Marleny Stawskiej uważam za bardzo aktualną i ważną naukowo.

Strona formalna rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń. Skonstruowana została w sposób tradycyjny, składa się z 10 podstawowych części: Przeglądu literatury, Celu Pracy, Materiałów i Metod, Wyników, Dyskusji, Wniosków, Bibliografii i Załączników. Rozprawa liczy 203 strony, zawiera 44 rysunki i 35 tabel. Praca napisana jest starannie, jasno i zwięźle z zachowaniem właściwych proporcji pomiędzy poszczególnymi rozdziałami, może poza stosunkowo obszernym rozdziałem Wyniki. Dostrzegłem w niej stosunkowo niewielką liczbę błędów stylistycznych i edytorskich. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy zaawansowanych metod fizjologii roślin, biochemii, biologii molekularnej, narzędzi bioinformatycznych oraz metod statystycznych. Dane przedstawione zostały w sposób czytelny dla szerokiego grona czytelników.

Analiza zawartości merytorycznej pracy pozwala wyróżnić sześć zasadniczych części. W Przeglądzie literatury Doktorantka opisała szeroko zagadnienia związane z ogólną charakterystyką nasion, oraz opisała podstawowe procesy zachodzące w nasionach, koncentrując się na spoczynku i kiełkowaniu nasion. Opisała szczegółowo rolę czynników zewnętrznych takich jak temperatura i światło na biologię nasion: ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion, skupiając się na mechanizmach molekularnych leżących u podstaw regulacji kiełkowania. Doktorantka omówiła następnie szczegółowo zagadnienia związane rolą temperatury, światła czerwonego i niebieskiego w biologii nasion, zwracając szczególną uwagę na receptory oraz czynniki transkrypcyjne regulujące odpowiedzi roślin na czynniki środowiskowe, jak np. HY5 (Elongated Hypocotyl 5) i HYH (HY5 Homolog), czy HFR1 (Long Hypocotyl In Far-Red). Następnie doktorantka omówiła czynniki endogenne warunkujące ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion: gibereliny i kwas abscysynowy oraz reaktywne formy tlenu (ROS). Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w szeroki zakres badań fizjologicznych nad kiełkowaniem nasion, i jednocześnie stanowi rozwinięcie prowadzonych wcześniej prac badawczych. W opinii recenzenta ta część pracy napisana jest zwięźle i wyczerpująco, z wykorzystaniem wielu współczesnych publikacji naukowych, wprowadzając w zagadnienia obejmujące temat pracy, stanowiąc podstawę do podjęcia opisywanych badań.

**W trakcie recenzji tego rozdziału zastanowiła mnie jedna sprawa. Dlaczego Doktorantka klasyfikację typów spoczynku oparła tylko na pracy Gniazdowskiej i wsp. (2013), a nie wymieniła poprzednich jej twórców?**

Na podstawie ww. danych mgr inż. Marlena Stawska sformułowała Cel pracy. Celem pracy była charakterystyka biologicznej funkcji wybranych genów kodujących białka uczestniczące w szlaku sygnałowym światła oraz określenie potencjalnych interakcji pomiędzy ścieżką sygnałową światła a metabolizmem i transdukcją sygnałów indukowanych przez ROS/ABA/GA w kiełkowaniu nasion *A. thaliana*. Postawione szczegółowe pytania badawcze zostały opisane jasno i zwięźle, w sposób czytelny i logiczny wprowadzając do przeprowadzonych eksperymentów. Jednocześnie wyczerpują one całą gamę zagadnień, które planowało się wykonać aby cel pracy został osiągnięty.

Rozdział Materiał i Metody został opisany zwięźle a jednocześnie szczegółowo wyczerpując informacje na temat użytego materiału doświadczalnego (nasion *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantów i transformantów) oraz zastosowanych metod biologii molekularnej, biochemii i nasiennictwa.

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób bardzo obszerny, zajmując prawie 60 stron pracy, co świadczy o ogromie wykonanej pracy i liczbie wykonanych eksperymentów. Z drugiej strony analiza porównawcza dużej ilości danych stanowiła wyzwanie pod względem organizacyjnym i analitycznym, czyniąc w końcowym efekcie wyciąganie wniosków niełatwym zadaniem, z którym jednak Doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze. Doktorantka w pracy omówiła kiełkowanie nasion spoczynkowych i niespoczynkowych w różnych warunkach świetlnych: na świetle białym, niebieskim oraz w ciemności, w tym wpływ GA i ABA i ROS oraz regulatorów ich metabolizmu. Dodatkowo zbadała także wpływ różnych warunków świetlnych na ekspresję genów związanych z percepcją (*PHYA* i *PHYB*) i transdukcją sygnału świetlnego (TF: *HY5*, *HFR1* i *HYHFL*) oraz GA (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*, *RGL1*, *RGL2*, *RGL3*), ABA (geny metabolizmu ABA: *ABA1*, *NCED6*, *NCED9* i *CYP707A2*; geny transdukcji sygnału ABA: *ABI3*, *ABI4*, *ABI5*, *HAI1*, *HAI2* i *HAI3*) i ROS (*RBOHB*, *RBOHD*, *MAPK3*, *MAPK6*, *CAT2*, *FSD3*, *GR2*) w kiełkujących nasionach. Zbadała także wpływ GA, ABA i DPI na ekspresję wybranych genów uczestniczących w odbiorze bodźca świetlnego (*PHYA*, *PHYB*, *CRY1* i *CRY2*) w nasionach spoczynkowych i niespoczynkowych pęczniejących na świetle białym i w ciemności. Na podkreślenie zasługuje wykonanie przez Doktorantkę lokalizacji ROS *in situ* w zarodkach wyizolowanych z kiełkujących nasion *A. thaliana* inkubowanych w roztworach GA i ABA na świetle białym oraz w ciemności. Dokonała też analizy aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego (SOD, CAT i GR) w spoczynkowych i niespoczynkowych

nasionach *A. thaliana*, w ciemności i na świetle białym. Warty podkreślenia zagadnieniem było wykonanie przez doktorantkę oceny ilościowej białek karbonylowanych w nasionach *A. thaliana* kiełkujących w zróżnicowanych warunkach świetlnych. **Z drugiej strony brakuje mi analizy statystycznej tych wyników ilościowych. Byłaby to bardzo cenna informacja i podpora merytoryczna dyskusji i wniosków.**

W kolejnych badaniach Doktorantka zajęła się rolą czynników *HY5* i *HYH* w regulacji zależnego od światła kiełkowania nasion *A. thaliana* opierając się na badaniu mutantów *hy5* i transformantów z nadekspresją genów *HYP5* i *HYHFL*. Testowała też w tych doświadczeniach wpływ ABA, GA, NOR, PAC, DPI i MV na kiełkowanie tych nasion. Doktorantka dokonała też analizy ekspresji genów *HY5* i *HYHFL* w nasionach *A. thaliana* poddanych działaniu regulatorów kiełkowania w zróżnicowanych warunkach świetlnych. Kolejnym zagadnieniem badanym przez Doktorantkę była analiza aktywności promotorów genów *HY5* i *HYH* w nasionach kiełkujących w zróżnicowanych warunkach świetlnych w oparciu o wbudowany gen markerowy GUS. Doktorantka oprócz pozytywnego wpływu światła zaobserwowała różną aktywność badanych promotorów w różnych obszarach korzenia. **Czy te różnice wykazywały się jakimś logicznym porządkiem, a jeśli tak to jak go można zinterpretować?**

W kolejnych badaniach doktorantka analizowała rolę czynnika *HFR1* w regulacji zależnego od światła kiełkowania nasion *A. thaliana* opierając się na badaniu mutantu *hfr1* oraz transformanta charakteryzującego się nadekspresją genu *HFR1*. Analizowała kiełkowanie tych nasion pod wpływem ABA, GA, NOR, PAC, DPI i MV. Dokonała też analizy aktywności promotora genu *HFR1*, korzystając z techniki GUS, w nasionach kiełkujących w zróżnicowanych warunkach świetlnych. Tutaj również zaobserwowała specyficzną lokalizację aktywności promotora genu *HFR1*. Badała też wpływ czynników regulujących kiełkowanie na ekspresję genu *HFR1* w nasionach.

Po dokładnym zapoznaniu się z wynikami mogę stwierdzić, że Doktorantka bardzo sprawnie poradziła sobie z realizacją wyznaczonych wcześniej celów. Nie ustrzegła się jednak pewnych uchybień. **Po pierwsze w celu redukcji obszernych partii opisów wyników oraz lepszej ich interpretacji usunąłbym opisy nieistotnych ze statystycznego punktu widzenia wyników.** Rysunek 8 zawiera tyle danych, że jego interpretacja jest trudna. Sugerowałbym albo rozbić go na kilka rysunków, albo zamianę linii na słupki. **Wydaje mi się też, że przy**

**analizach porównawczych wpływu światła i ciemności zabrakło analizy statystycznej pod względem tego czynnika.** A to ułatwiło by podsumowanie wyników i postawienie wniosków. Na niektórych rysunkach brakuje literowych oznaczeń istotności różnic (np. Rys. 13 a), albo są one umieszczone niewłaściwie (np. Rys. 13 b). Istotne zmiany opisywałbym też jako procentowe, albo ewentualnie krotność, bez posługiwania się jednostkami względnymi. **Na Rys. 10 w opisie podane jest, że zastosowano m. in. roztwory PAC i NOR, natomiast na samym rysunku w świetle białym jest tylko zamieszczony wpływ PAC, natomiast w ciemności tylko wpływ NOR. Z czego to wynika?**

Dyskutując otrzymane wyniki i dane literaturowe mgr inż. Marlena Stawska szeroko omówiła, porównała i podsumowała obecny stan wiedzy na temat kiełkowania nasion pod wpływem światła. Przeprowadzone analizy biologiczne, molekularne i biochemiczne z wykorzystaniem nasion dzikich *A. thaliana* oraz mutantów i transformantów tego gatunku, charakteryzujących się różnym stopniem spoczynku, pęczniejących w roztworach fitohormonów i ich inhibitorów oraz substancji kontrolujących poziom ROS, umożliwiły zaproponowanie nowych, potencjalnych mechanizmów regulacji kiełkowania przez światło niebieskie oraz określenie roli wybranych genów kodujących m.in. czynniki transkrypcyjne, takie jak: HY5, HYH i HFR1. Wartym podkreślenia osiągnięciem pracy jest stwierdzenie stymulującej roli światła niebieskiego, głównie poprzez fitochrom, w procesie kiełkowania nasion rośliny dwuliściennej *A. thaliana*, w przeciwieństwie do hamującej jego roli w kiełkowaniu nasion roślin jednoliściennych.

Dyskutując wpływ światła niebieskiego na modulację metabolizmu i szlaku sygnałowego ABA w kiełkujących nasionach **Doktorantka wynioskowała, że inhibicja biosyntezy ABA *de novo* przez NOR bierze w znacznym stopniu udział w hamowaniu kiełkowania nasion spoczynkowych w ciemności. Czy nie jest to w sprzeczności z ogólnie znaną rolą ABA? Chyba chodziło o to, że inhibicja syntezy ABA przez NOR stymuluje kiełkowanie nasion w ciemności poprzez obniżenie poziomu tego hormonu?**

Doktorantka wykazała również, że istnieje zależny od światła i głębokości spoczynku mechanizm regulacji zwrotnej poziomu genów kodujących receptory światła przez ABA. Stwierdziła też, że światło niebieskie stymuluje kiełkowanie nasion poprzez hamowanie biosyntezy ABA i może to być mechanizm zbliżony do tego jakim charakteryzuje się działanie

światła czerwonego. Nowatorskim odkryciem było także to, że światło niebieskie stymuluje kiełkowanie nasion *A. thaliana* nie tylko poprzez hamowanie metabolizmu ABA, ale również poprzez hamowanie ekspresji poszczególnych elementów transdukcji sygnału tego fitohormonu (ABI i HAI). Analizując szlak sygnałowy GA i światła Doktorantka wykryła, że CRY1 a nie CRY2 może pełnić istotną rolę podczas stymulacji kiełkowania nasion przez światło niebieskie z udziałem GA. Ciekawym osiągnięciem jest stwierdzenie, że podwyższenie poziomu GA spowodowane stymulacją ekspresji genów biosyntezy tego fitohormonu przez światło niebieskie skutkuje akumulacją ROS, która dodatkowo pozytywnie wpływa na proces kiełkowania. **Skąd wiadomo, że ekspresja *GID1a* jest odwrotnie proporcjonalna do poziomu GA w komórkach? A tak to można wyczytać w pracy.**

Osiągnięciem pracy jest też potwierdzenie istnienia mechanizmu stymulacji kiełkowania przez światło niebieskie na skutek hamowania jednego z negatywnych regulatorów transdukcji sygnału GA jakim jest RGL2. Stwierdziła też, że ścieżki percepcji i transdukcji sygnału GA zarówno na świetle niebieskim jak i białym mają identyczne podłoże molekularne i biochemiczne. Na podkreślenie zasługuje zbadanie po raz pierwszy zależności pomiędzy metabolizmem ROS a warunkami świetlnymi i stopniem spoczynku nasion. Doktorantka wskazała na potencjalną rolę ROS w regulacji bodźca świetlnego poprzez CRY1 i CRY2 i spoczynek nasion.

Stwierdziła też, że akumulacja ROS zachodząca w nasionach podczas kiełkowania na świetle jest prawdopodobnie związana z modyfikacją poziomu transkryptów genów i aktywności białek regulujących biosyntezę i degradację tych cząsteczek takich jak np. oksydaza NADPH, czy też obniżeniem ekspresji genów biosyntezy ABA. Doktorantka zauważyła też, że w nasionach spoczynkowych wysoka zawartość ABA jest skorelowana z niską zawartością  $O_2^{\cdot-}$  i odwrotnie w nasionach niespoczynkowych wysoki poziom GA jest związany z wyższym poziomem  $O_2^{\cdot-}$ . Potwierdziła też, że światło może pełnić pozytywną rolę w regulacji aktywności SOD, i w ten sposób głębokości spoczynku.

Interesującym wynikiem pracy było po raz pierwszy zademonstrowanie, że ilość karbonylowanych białek w poszczególnych etapach kiełkowania zależy od warunków świetlnych, generalnie wyższy w świetle. **Szkoda, że tych białek nie zidentyfikowano.**

Badając nasiona *hy5* (mniej spoczynkowe od odmiany dzikiej) Doktorantka określiła, że czynnik HY5 jest negatywnym regulatorem zależnego od światła kiełkowania nasion *A. thaliana*. Jego ekspresja ulegała zwieszeniu przez ABA, hamując kiełkowanie, co stanowi nowatorskie odkrycie. Podobnie jak zbadanie, że czynnik HY5 może być pozytywnym regulatorem metabolizmu GA podczas kiełkowania nasion na świetle. Dodatkowa doktorantka wykazała pozytywną rolę genu *HYH* w regulacji zależnego od światła kiełkowaniu nasion poprzez pozytywną modulację transdukcji sygnału i metabolizmu GA.

Szeroko przeprowadzone badania, po dyskusji wyników i danych literaturowych zostały podsumowane w formie logicznych i zwięzłych Wniosków.

Podsumowując, wymienione wyżej drobne uchybienia nie wpływają w istotny sposób na wysoką ocenę pracy. Stanowi ona istotny wkład w poznanie mechanizmu kiełkowania nasion pod wpływem światła. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że mgr inż. Marlena Stawska jest sprawnym i utalentowanym badaczem posiadającym szeroką i ugruntowaną wiedzę. Wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Marleny Stawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Tomasz Pawłowski