



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, 02.09.2021

Ocena pracy doktorskiej mgr Izabeli Kołodziejczyk pt. „Egzogenna melatonina jako czynnik modyfikujący metabolizm kiełkujących nasion kukurydzy (*Zea mays* L.)” wykonanej w Katedrze Ekofizjologii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty M. Posmyk

Ocena formalna

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Izabeli Kołodziejczyk było poznanie złożoności mechanizmu podnoszenia jakości nasion kukurydzy i odporności kiełkowania na stres chłodu nasion poprzez zastosowanie naturalnego fitobiostymulatora melatoniny. Podjęte badania wyjaśniają na poziomie fizjologicznym, biochemicznym, cytologicznym i molekularnym fenomen pozytywnego działania melatoniny na kiełkowanie nasion i wzrost roślin. Wybór tematyki pracy z powodu połączenia aspektu praktycznego z badaniami podstawowymi uważam za bardzo interesujący i zasadny. Wpisuje się to w obecną tendencję godzenia prac badawczych obejmujących rozwiązywanie problemów gospodarczych, naukowych oraz środowiskowych. Badania przeprowadzone w trakcie wykonywania recenzowanej pracy doktorskiej w znaczącym stopniu wpływają na poszerzenie wiedzy o zjawiskach zachodzących w trakcie wzrostu roślin pod wpływem biostymulatorów. Wyniki pracy stanowią podstawę naturalnego kierunku poprawiania jakości roślin użytkowych w obliczu czynników stresowych. Z tych względów tematykę rozprawy mgr Izabeli Kołodziejczyk uważam za bardzo aktualną i ważną naukowo.

Strona formalna rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń. Rozprawa została przygotowana na podstawie czterech artykułów naukowych opublikowanych w

Journal of Elementology, Acta Physiologiae Plantarum (dwie prace), Journal of Plant Physiology, oraz manuskryptu artykułu, który w trakcie wykonywania recenzji został opublikowany w International Journal of Molecular Sciences. Są to czasopisma o ustalonej renomie, publikujące recenzowane prace opisujące wartościowe wyniki naukowe. Mgr Izabela Kołodziejczyk jest pierwszym autorem wszystkich artykułów wchodzących w skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej. Z dołączonych do pracy oświadczeń współautorów wynika, że miała znaczący udział nie tylko w projektowaniu i wykonaniu opisanych w obu artykułach doświadczeń, ale również w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów do druku. Opublikowane prace stanowiące najważniejszą część rozprawy są spójne tematycznie i w pełni odpowiadają jej tytułowi. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy metod ekofizjologii roślin, oraz metod statystycznych.

Do artykułów naukowych wchodzących w skład ocenianej rozprawy mgr Izabela Kołodziejczyk dołączyła rozdziały: Źródła finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, Współpraca, Wykaz elementów wchodzących w skład mieszanej pracy doktorskiej, Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników, Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Dorobek naukowy. Kopie publikacji, manuskrypt, oświadczenia współautorów oraz wydruk raportu Web of Science stanowią załączniki pracy.

W rozdziale Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników, podrozdział Wprowadzenie, Doktorantka omówiła aktualny stan wiedzy na temat metod polepszania jakości nasion, takich jak kondycjonowanie/priming, ze szczególnym uwzględnieniem dodatkowego zastosowania naturalnych bioaktywnych substancji stymulujących. Mgr Izabela Kołodziejczyk następnie omówiła obiekt badań oraz fizjologiczne działanie melatoniny wprowadzając do tematu pracy doktorskiej. Doktorantka w sposób zwięzły i logiczny przedstawiła ogólny zarys i tło badanego zagadnienia wyjaśniając podstawę podjętych badań.

Po tym interesującym wprowadzeniu w tematykę rozprawy mgr Izabela Kołodziejczyk przedstawiła cel swojej pracy oraz hipotezy badawcze. Celem podjętych badań było udokumentowanie korzystnego wpływu melatoniny na metabolizm kiełkujących nasion kukurydzy i zbadanie jakie procesy indukuje/stymuluje melatonina w roślinie poszerzając jej tolerancję na stres chłodu i wzmagając proces regeneracji po jego ustąpieniu. Doktorantka

założyła, że efekt działania melatoniny będzie korzystny, szczególnie w okresie chłodu. Drugą część celu pracy ująłbym raczej jako poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za korzystne działanie melatoniny. Doktorantka postawiła pierwotną hipotezę badawczą zakładającą, że przedsięwzięte kondycjonowanie będzie efektywną metodą aplikacji melatoniny do nasion, i podniesiony poziom MEL ograniczy negatywne działanie chłodu podczas kiełkowania poprzez ograniczenie stresu oksydacyjnego. Wyniki badań proteomicznych wpłynęły na postawienie hipotezy wtórnej mówiącej o tym, że ilościowe zmiany białek generowane pod wpływem melatoniny mogą być rezultatem powielenia materiału genetycznego w strefach bazalnych zarodków przez endoreduplikację. Myślę, że raczej jest to wniosek z badań niż hipoteza, którą zasadniczo powinno się postawić przed podjęciem badań. Doktorantka omówiła następnie cele szczegółowe pracy. Rozprawa doktorska wpisuje się zatem w szeroki zakres badań fizjologicznych nad rozwojem roślin. W opinii recenzenta ta część pracy napisana jest zwięźle, wprowadzając w zagadnienia obejmujące temat pracy, uzasadniając podjęcie opisywanych badań. Poszczególne zadania badawcze zostały opisane jasno i zwięźle, w sposób czytelny i logiczny wprowadzając do przeprowadzonych eksperymentów. W kolejnym podrozdziale pracy Doktorantka opisała metodykę badań. Wydaje się, że zaplanowano bardzo dobrze etapy przeprowadzania badań, korzystając z różnorodnych i nowoczesnych technik analitycznych.

W pracy zaprezentowano także zwięźle omówienie wyników badań zamieszczonych w pięciu artykułach wchodzących w skład rozprawy, uzupełnione o interpretację zawartych w nich wyników w świetle danych uzyskanych i opublikowanych przez innych autorów. Omówienie artykułów kończy podrozdział Wnioski, w którym mgr Izabela Kołodziejczyk przedstawiła najważniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej. Mówiąc bardzo ogólnie, najważniejszymi osiągnięciami Doktorantki jest opracowanie techniki hydrokondycjonowania nasion kukurydzy z użyciem MEL jako naturalnego biostymulatora, zapewniającej optymalne wyniki kiełkowania nasion oraz wzrostu zarodka w warunkach stresu chłodu, odkrycie nowej funkcji MEL jako regulatora w biochemicznym kalendarzu nasion, wykazanie pozytywnego wpływu MEL na aktywność enzymów antyoksydacyjnych i detoksykujących, oraz wykazanie pozytywnego wpływu MEL na biosyntezę nowych białek związanych z metabolizmem energetycznym, metabolizmem białek oraz obroną. Białka te określa markerami jakości nasion. Wykazała też indukcję poliploidyzacji w komórkach zarodka traktowanych MEL, co ma znaczenie w dostosowaniu się roślin do niekorzystnych zmian

środowiskowych. Chciałbym zwrócić również uwagę, że przedstawione w pracy wyniki pozwoliły na określenie MEL jako niedrogiego, bezpiecznego biostymulatora roślin, który mógłby być stosowany powszechnie w uprawach ekologicznych. Wyniki wpisują się też w szeroki nurt badań nad fizjologicznymi i molekularnymi podstawami procesów odporności roślin na stres.

Do części poprzedzającej artykuły naukowe dodano także najnowszą dobrze dobraną literaturę naukową, na podstawie której Doktorantka przygotowała omówienie wyników zawartych w opublikowanych pracach stanowiących podstawę pracy doktorskiej.

Stwierdzam, że rozprawa przygotowana przez mgr Izabelę Kołodziejczyk spełnia formalnie wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia, w których współautorzy wykorzystanych przez Doktorantkę artykułów naukowych, dokładnie opisują udział Doktorantki i swój w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wkład Doktorantki w przygotowaniu prac do druku był znaczący (wynoszący odpowiednio 90, 45, 70 i 70%) i w pełni uzasadnione jest, aby mgr Izabela Kołodziejczyk doktoryzowała się na podstawie tych pięciu artykułów. Wszystkie opublikowane prace ukazały się w znanych czasopismach, których redakcje akceptują prace na podstawie recenzji przygotowanych przez pracujących w podobnym temacie naukowców. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

Szczególnym osiągnięciem pracy jest wykazanie po raz pierwszy związku aplikowania MEL do nasion kukurydzy z występowaniem endocykli w strefie bazalnej zarodka w warunkach stresu chłodu, co jest elementem ważnym w przeżywalności roślin. Doktorantka zauważyła tutaj ważność posiadania narzędzi indukujących i kontrolujących jakość i ilość planów, a MEL jest dobrym do tego kandydatem. Za osiągnięcie pracy uważam też wskazanie ścieżek metabolicznych odpowiedzialnych za fenomen lepszej tolerancji stresu i skuteczniejszej regeneracji po jego ustąpieniu na skutek zastosowania MEL (wynik badań proteomicznych).

Po zapoznaniu się z wynikami pracy mogę stwierdzić, że Doktorantka bardzo sprawnie poradziła sobie z realizacją wyznaczonych wcześniej celów oraz odpowiedziała na postawione hipotezy.

W pracy znalazłem stosunkowo niewiele niedociągnięć. Np. użyła słowa akcelerować, chyba nie ma takiego wyrazu w języku polskim? Recenzja pracy nasunęła mi też parę pytań. Po pierwsze: jakie są różnice w budowie melatoniny i fitomelatoniny? Czy jest wspólny mechanizm powiązań MEL z wyznaczaniem sezonowości u zwierząt i u roślin? Czy podobieństwo między melatoniną a auksyną implikuje też podobieństwo w działaniu?

Ocena merytoryczna

1. Kołodziejczyk I., Posmyk M.M. 2016. Melatonin – a new plant biostimulator? J. Elementology 21:1187-1198.

Pierwsza praca, która wchodzi w skład ocenianej rozprawy doktorskiej jest pracą przeglądową. Omawiana jest w niej rola melatoniny, znanego hormonu zwierzęcego i neuroprzekaźnika, w roślinach. Z dotychczasowych badań wynika, że najczęściej jest jej obecne w nasionach. Jej rola jest związana z wychwytywaniem wolnych rodników, oraz biostymulacją wzrostu, szczególnie w warunkach stresu, oraz z rozwojem rośliny: w czasie kwitnienia, owocowania i starzenia. Praca przeglądowa stanowi wprowadzenie w tematykę badań będących podstawą ocenianej pracy doktorskiej, jednocześnie stawia hipotezę o pozytywnej roli egzogennej melatoniny w poprawie jakości nasion. Hipoteza ta została poparta pierwszymi eksperymentami z zastosowaniem metody kondycjonowania nasion z użyciem melatoniny, wykonanymi w Katedrze Ekofizjologii Roślin pod kierunkiem Pani Promotor. Wartym podkreślenia jest stwierdzenie pozytywnego wpływu melatoniny na wzrost plonowania roślin. Ten interesujący przegląd został oparty na najnowszej literaturze naukowej. Doktorantka umiejętnie dobrała omawiane artykuły naukowe, dyskutując różne aspekty roli melatoniny.

2. Kołodziejczyk I., Bałabusta M., Szewczyk R., Posmyk M.M. 2015. The levels of melatonin and its metabolites in conditioned corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds during storage. Acta Physiol. Plant. 37: 105.

Druga praca, która weszła w skład rozprawy mgr Izabeli Kołodziejczyk dotyczy określenia efektywności działania melatoniny na nasiona kukurydzy i ogórka podczas przechowywania. Interesujące jest wykazanie w pracy sezonowej zmienności zawartości endogennej melatoniny (wzrost w okresie zimowym), co może być związane z sezonowym rytmem (endogennym zegarem biologicznym) regulacji rozwoju roślin niezależnym od czynników środowiska.

Wartym podkreślenia w pracy jest też wykonanie szeregu analiz ilościowych i jakościowych pochodnych melatoniny z wykorzystaniem nowoczesnych metod spektrometrii mas. Artykuł generalnie jest dobrze napisany, wiele aspektów gruntownie zostało przedyskutowanych, w końcowym momencie postawione zostały wnioski oraz określona została perspektywa kolejnych badań.

3. Kołodziejczyk I., Dzitko K., Szewczyk R., Posmyk M.M. 2016. Exogenous melatonin expediently modifies proteome of maize (*Zea mays* L.) embryo during seed germination. *Acta Physiol. Plant.* 38: 146.

Trzecia praca przedstawia wyniki analiz proteomicznych nasion kukurydzy poddanych działaniu melatoniny w czasie kiełkowania. Jest to pierwsza publikacja, która prezentuje wyniki tego typu badań w układzie melatonina – nasiono. Badania, co ciekawe, pokazały bardzo wiele białek różnicujących wariant kontrolny od wariantu traktowanego MEL, przy czym większość z tych białek udało się zidentyfikować. Analiza funkcjonalna białek pokazała, że wraz z poprawą parametrów kiełkowania nasion pod wpływem MEL syntetyzowane są białka związane z obroną przed czynnikami stresowymi, oraz następuje wykorzystanie materiałów zapasowych w celu pozyskania energii. Ciekawe jest też w tym kontekście, zidentyfikowanie białek związanych z metabolizmem polifenoli, podziałami komórkowymi, oraz białka hamującego śmierć komórki. W związku z wygenerowaniem dużej liczby danych analiza wyników nie jest zadaniem łatwym, zastosowanie odpowiednich narzędzi generujących np. sieć powiązań pomiędzy zidentyfikowanymi białkami ułatwiła by interpretację i percepcję wyników.

4. Kołodziejczyk I., Dzitko K., Szewczyk R., Posmyk M.M. 2016. Exogenous melatonin improves corn (*Zea mays* L.) embryo proteome in seeds subjected to chilling stress. *J. Plant Physiol.* 193: 47-56.

Czwarta praca prezentuje wyniki badań nad rolą melatoniny w odpowiedzi rośliny na stres chłodu. Badania wykonano na poziomie molekularnym – zmian w proteomie nasion kukurydzy. We wstępie pracy Doktorantka omówiła mechanizm działania melatoniny w odpowiedzi na różnorodne stresy środowiskowe, wykorzystując w tym najnowsze dane literaturowe. Zidentyfikowano 78 białek różnicujących warianty eksperymentalne. Analiza funkcjonalna pokazała, że pozytywna rola melatoniny w odpowiedzi na stres związana jest ze

zwiększoną syntezą białek obronnych oraz białek regulujących funkcję innych białek. Badania te doktorantka podsumowuje stwierdzeniem o pozytywnej roli melatoniny w obronie przeciwko szkodliwym czynnikom środowiska poprzez regulację ogólnego metabolizmu rośliny.

5. Kołodziejczyk I., Kaźmierczak A., Posmyk M.M. 2021. Melatonin application modifies antioxidant defence and induced endoreduplication in maize seeds exposed to chilling stress. IJMS.

Piąta praca, która została załączona jako część rozprawy doktorskiej w formie manuskryptu przesłanego do redakcji, została opublikowana w czasie wykonywania recenzji. Wyniki badań pokazały pozytywny wpływ melatoniny na regenerację roślin po stresie chłodu. Wykazano jej własną antyoksydacyjną rolę, oraz wpływ na zwiększenie się aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Po raz pierwszy pokazano też, że metionina indukuje obronę rośliny poprzez wzrost endoreplikacji w komórkach zarodkowych, co poprawia regenerację roślin. Ten wynik pracy doktorskiej wydaje się być bardzo ciekawy i nowatorski w aspekcie użycia biostymulatora.

Wnioski końcowe

Podsumowując, wymienione wyżej uchybienia nie wpływają w istotny sposób na ocenę pracy. Stanowi ona ważny wkład w poznanie mechanizmów wzmacniania jakości roślin. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że mgr Izabela Kołodziejczyk jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wyniki badań są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr Izabeli Kołodziejczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Izabeli Kołodziejczyk, w związku ze szczególnymi walorami poznawczymi i aplikacyjnymi pracy. Wyniki pracy doktorskiej prezentują nowe światło na ekofizjologiczny mechanizm działania

biostymulatorów, poprawiających plonowanie roślin oraz odporność na czynniki stresowe związane ze zmianą klimatu.



Tomasz Pawłowski