



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

prof. dr hab. Adriana Szmidt-Jaworska
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Biologii Systemów
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
e-mail: asjawors@umk.pl

Toruń, 2026-08-24

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

Pana mgr. Marcina Kamila Tymińskiego

**pt. „Tlenek azotu – cząsteczka modyfikująca ilość, jakość i funkcjonalność białek osi
zarodkowych nasion jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) poddanych starzeniu”**

przygotowanej pod kierunkiem dr hab. Urszuli Krasuskiej, prof. SGGW

Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin, Instytut Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wprowadzenie

Starzenie się stanowi nieodłączny etap ontogenezy każdego organizmu. Jest to naturalny proces, uwarunkowany czynnikami genetycznymi, regulowany hormonalnie oraz modyfikowany przez warunki środowiskowe, prowadzący do stopniowego pogorszenia funkcjonowania komórek, tkanek i organów, a ostatecznie do ich obumarcia. Przebieg oraz znaczenie biologiczne procesu starzenia różnią się istotnie pomiędzy organizmami zwierzęcymi i roślinnymi. W przeciwieństwie do zwierząt wiele gatunków roślin zachowuje przez całe życie zdolność do wytwarzania nowych organów, w związku z czym proces starzenia obejmuje najczęściej poszczególne organy lub ich części, takie jak liście, kwiaty czy owoce, a nie cały organizm jednocześnie. Tym samym nie jest to proces wyłącznie degradacyjny, lecz stanowi ważny element ich programu rozwojowego i adaptacyjnego.

Szczególne znaczenie proces starzenia nabiera w odniesieniu do nasion, ponieważ prowadzi do stopniowej utraty ich żywotności i wigoru, czego konsekwencją jest obniżenie zdolności kiełkowania oraz pogorszenie jakości rozwijających się siewek. Z punktu widzenia rolnictwa zjawisko to obniża wartość materiału siewnego, wpływa niekorzystnie na efektywność produkcji

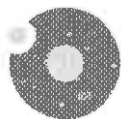


roślinnej oraz zmniejsza wielkość i jakość uzyskiwanych plonów, powodując wymierne straty ekonomiczne. W konsekwencji badania nad mechanizmami starzenia się nasion stanowią istotny kierunek badań zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Lepsze poznanie czynników odpowiedzialnych za utratę żywotności nasion oraz mechanizmów regulujących proces ich starzenia stwarza podstawy do doskonalenia metod przechowywania i oceny jakości materiału siewnego, a także opracowania strategii ograniczających procesy degradacyjne. Działania te mają kluczowe znaczenie zarówno dla zwiększenia efektywności produkcji rolniczej, jak i długoterminowego zachowania zasobów genetycznych roślin.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny i istotny nurt badań dotyczących mechanizmów starzenia się nasion oraz możliwości ograniczania negatywnych skutków tego procesu. W związku z rosnącym znaczeniem badań nad zachowaniem żywotności materiału siewnego podczas przechowywania, problematyka podjęta przez Mgr Marcina Tymińskiego zasługuje na szczególną uwagę.

Ocena formalna

Rozprawa doktorska Mgr. Marcina Tymińskiego ma formę spójnego tematycznie cyklu publikacji, obejmującego cztery oryginalne prace opublikowane w uznanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, zaliczanych do pierwszego kwartyłu (Q1) w dyscyplinie nauk o roślinach (*Plants*, *Frontiers in Plant Science*, *Planta* oraz *Plant Science*). Łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, zgodnie z rokiem opublikowania prac) wynosi 18,158, natomiast suma punktów według obowiązującego wykazu ministerialnego wynosi 370. W trzech publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, natomiast w jednej zajmuje drugą pozycję. Uwzględniając wieloautorski charakter publikacji oraz dołączone oświadczenia współautorów, należy stwierdzić, że udział Doktoranta w opracowaniu przedstawionych prac był znaczący i w pełni uzasadnia włączenie ich do rozprawy doktorskiej. Dysertacja została przygotowana zgodnie z wymaganiami stawianymi rozprawom doktorskim, opartych na cyklu publikacji naukowych. Oprócz kopii artykułów stanowiących podstawę osiągnięcia rozprawa zawiera autorskie opracowanie, obejmujące spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy. Kolejne części obejmują wprowadzenie do problematyki badawczej, hipotezy



badawcze, syntetyczne omówienie najważniejszych wyników wraz z ich dyskusją, a także podsumowanie i wnioski. Całość uzupełniają spisy rycin i tabel, wykaz wykorzystanej literatury, zestawienie dorobku naukowego Doktoranta oraz oświadczenia.

Pod względem formalnym rozprawa została przygotowana starannie i zgodnie z obowiązującymi standardami. Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a poszczególne części tworzą spójną całość. Autor w syntetyczny sposób przedstawił aktualny stan wiedzy, uzasadnił podjęcie problematyki badawczej oraz właściwie osadził własne wyniki w kontekście dotychczasowych badań. W tej części rozprawy nie zgłaszam uwag natury formalnej.

Ocena merytoryczna

Problematyka podjęta w rozprawie doktorskiej wpisuje się w wieloletni nurt badań nad fizjologią nasion prowadzonych w Katedrze Botaniki i Fizjologii Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Mgr Marcin Tymiński podjął próbę wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za ochronne działanie tlenu azotu (NO) w procesie starzenia nasion jabłoni domowej (*Malus domestica* Borkh.). Tematyka ta jest aktualna i naukowo uzasadniona, gdyż łączy zagadnienia fizjologii nasion, biologii stresu oksydacyjnego oraz molekularnych mechanizmów regulujących utratę żywotności materiału siewnego. Szczególnie wysoko oceniam fakt, że Doktorant nie ograniczył się do opisowej charakterystyki zmian towarzyszących starzeniu nasion, lecz podjął próbę wyjaśnienia ich podłoża biochemicznego i molekularnego oraz określenia mechanizmów odpowiedzialnych za ochronne działanie NO. Takie podejście znacząco zwiększa wartość poznawczą rozprawy.

Celem rozprawy było określenie, czy egzogenna aplikacja tlenu azotu może ograniczać negatywne skutki starzenia nasion poprzez modulowanie procesów związanych z homeostazą reaktywnych form tlenu i azotu, reakcjami redoks oraz ilością, jakością i funkcjonalnością białek osi zarodkowych. Realizacja tego celu wymagała weryfikacji hipotez badawczych dotyczących wpływu starzenia nasion jabłoni na zawartość meta-tyrozyny (m-Tyr) oraz określenia, czy krótkotrwałe traktowanie izolowanych zarodków tlenkiem azotu wpływa na wybrane procesy biochemiczne i molekularne zachodzące w osiach zarodkowych. Przyjęte hipotezy pozostają w ścisłym związku z celem rozprawy, a ich weryfikacja umożliwiła wieloaspektowe spojrzenie na mechanizmy odpowiedzi nasion na starzenie oraz działanie NO.



Przedstawiona rozprawa nie stanowi prostego zestawienia wyników uzyskanych w kolejnych publikacjach, lecz tworzy spójną i konsekwentnie realizowaną koncepcję badawczą, ukierunkowaną na wyjaśnienie mechanizmów ochronnego działania tlenu azotu w procesie starzenia nasion. Poszczególne publikacje odpowiadają kolejnym etapom realizacji tego celu, a uzyskane wyniki wzajemnie się uzupełniają, prowadząc do sformułowania spójnych i dobrze udokumentowanych wniosków.

Na szczególne podkreślenie zasługuje szeroki i nowoczesny warsztat badawczy wykorzystany przez Doktoranta. Badania przeprowadzono na zarodkach izolowanych z nasion jabłoni domowej poddanych zabiegowi sztucznego przyspieszonego starzenia. Zastosowano komplementarne metody fizjologiczne, biochemiczne, molekularne i proteomiczne, obejmujące wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), analizy spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne, analizę ekspresji genów metodą RT-qPCR oraz spektrometrię mas MALDI-TOF MS. Połączenie tych technik umożliwiło ocenę badanego procesu na kilku poziomach organizacji biologicznej. Dobór metod był przemyślany i adekwatny do postawionych hipotez, a uzyskane wyniki wzajemnie się uzupełniają, zwiększając wiarygodność wyciągniętych wniosków.

Pewnym ograniczeniem przyjętego modelu badawczego jest wykorzystanie izolowanych zarodków, a nie całych nasion z zachowanymi okrywkami nasiennymi. Zastosowanie takiego materiału było uzasadnione z punktu widzenia prowadzonych analiz, gdyż pozwalało ograniczyć wpływ tkanek okrywających i bezpośrednio ocenić odpowiedź osi zarodkowych. Jednocześnie utrudnia ono bezpośrednie przełożenie uzyskanych wyników na warunki praktycznego przechowywania materiału siewnego. Kwestia ta zasługuje na dyskusję, zwłaszcza w kontekście potencjalnego zastosowania NO w technologii nasiennej. Wyniki uzyskane przez Doktoranta wykazały, że odpowiedź osi zarodkowych na starzenie ma charakter dynamiczny i zależy od stopnia zaawansowania zmian zachodzących w nasionach. Wraz z wydłużaniem czasu starzenia obserwowano postępującą utratę żywotności zarodków oraz wzrost liczby siewek wykazujących nieprawidłowości rozwojowe. Jednocześnie zastosowanie egzogennej NO poprawiało zdolność kiełkowania izolowanych zarodków, jednak skuteczność tego działania malała wraz z postępem starzenia. Wynik ten wskazuje, że ochronne działanie tlenu azotu nie ma charakteru bezwzględnie, lecz zależy od zachowania przez komórki określonego potencjału naprawczego.

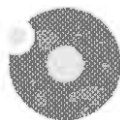


Cykl publikacji tworzących rozprawę został zaplanowany w sposób logiczny i konsekwentny. Poszczególne artykuły stanowią kolejne etapy realizacji jednego programu badawczego, obejmującego zagadnienia stresu oksydacyjnego, metabolizmu meta-tyrozyny, homeostazy glutationowej, ekspresji genów, potranslacyjnych modyfikacji białek oraz systemów odpowiedzialnych za kontrolę jakości proteomu. Wyniki kolejnych prac uzupełniają się i prowadzą od charakterystyki wybranych markerów starzenia do wyjaśnienia bardziej złożonych mechanizmów działania NO.

Pierwsza publikacja, zatytułowana „*Toxicity of meta-Tyrosine*” i opublikowana w czasopiśmie *Plants*, ma charakter przeglądowy. Autor dokonał w niej krytycznej analizy aktualnego stanu wiedzy dotyczącego powstawania meta-tyrozyny, jej właściwości biologicznych oraz mechanizmów odpowiedzialnych za jej toksyczne działanie w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Praca ta stanowi wartościowe wprowadzenie do dalszych badań eksperymentalnych, ponieważ porządkuje wiedzę dotyczącą m-Tyr i uzasadnia jej wybór jako jednego z analizowanych wskaźników zmian towarzyszących starzeniu nasion.

Pierwsza praca eksperymentalna, „*Nitric oxide - an antidote to seed aging modifies meta-tyrosine content and expression of aging-linked genes in apple embryos*”, opublikowana w *Frontiers in Plant Science*, dotyczyła wpływu krótkotrwałego działania NO na zawartość m-Tyr oraz ekspresję 18 wybranych genów potencjalnie związanych z regulacją starzenia i żywotności nasion, ochroną i naprawą białek oraz autofagią. Doktorant wykazał, że postępującemu starzeniu towarzyszyło obniżenie poziomu transkryptów większości analizowanych genów, natomiast odpowiedź na działanie NO była zależna zarówno od czasu starzenia, jak i funkcji badanego genu. Jednocześnie wyniki nie potwierdziły, aby ochronny efekt NO wynikał z ograniczenia akumulacji m-Tyr. Zawartość m-Tyr wzrastała wraz ze starzeniem, a wysoki stosunek m-Tyr/Tyr wiązał się z obniżeniem żywotności materiału.

Za mocną stroną tej pracy uważam próbę powiązania zmian ekspresji genów z fizjologicznymi skutkami starzenia. Pewien niedosyt pozostawia jednak ograniczenie analizy do wcześniej wytypowanej grupy genów. W związku z tym zasadne jest pytanie, jakimi kryteriami kierował się Doktorant przy ich wyborze oraz w jakim stopniu obejmowały one najważniejsze szlaki odpowiedzi na starzenie i NO. Interesującym rozwinięciem badań byłoby zastosowanie podejścia transkryptomicznego, takiego jak RNA-seq, które pozwoliłoby zidentyfikować także



wcześniej nieprzewidziane geny i szlaki regulacyjne. Nie traktuję braku takich analiz jako uchybienia, lecz jako element potencjalnej dyskusji.

W kolejnej publikacji, „*Reactive nitrogen species act as the enhancers of glutathione pool in embryonic axes of apple seeds subjected to accelerated ageing*”, opublikowanej w czasopiśmie *Planta*, Doktorant skoncentrował się na metabolizmie glutationu i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Oceniono poziom zredukowanego i utlenionego glutationu, aktywność reduktazy glutationowej oraz enzymów typu peroksydazy glutationowej. Wraz z postępem starzenia aktywność analizowanych enzymów ulegała obniżeniu, co wskazywało na stopniowe osłabienie sprawności systemu antyoksydacyjnego. Zastosowanie NO prowadziło na ogół do zwiększenia całkowitej puli glutationu, zwłaszcza jego formy zredukowanej, oraz do zwiększenia ekspresji wybranych genów i aktywności enzymów typu GPX-like. Szczególnie interesująca jest obserwacja, że wpływ NO zmieniał się wraz z czasem starzenia. Do około 14. dnia zabiegu tlenek azotu zwiększał aktywność zarówno reduktazy glutationowej, jak i enzymów typu GPX-like, natomiast po 21 dniach utrzymywał wpływ na GPX-like, lecz nie przywracał aktywności reduktazy glutationowej, mimo wzrostu poziomu jej transkryptów. Towarzyszyło temu gromadzenie utlenionego glutationu. Wyniki te wskazują na narastającą wraz ze starzeniem rozbieżność pomiędzy odpowiedzią na poziomie transkrypcyjnym a zdolnością komórki do odtworzenia sprawnego układu enzymatycznego.

Za jedno z ważniejszych osiągnięć tej części badań uważam wykazanie, że ochronne działanie NO ma wyraźną granicę zależną od stopnia zaawansowania starzenia. Jednocześnie nie można uznać, że po najdłuższym okresie starzenia NO pozostawał całkowicie nieskuteczny, ponieważ nadal zwiększał aktywność GPX-like i wywoływał część korzystnych odpowiedzi fizjologicznych. Wynik ten rodzi pytanie, które kieruję do Doktoranta, jaki parametr fizjologiczny, biochemiczny lub molekularny najlepiej wyznaczałby moment, w którym zastosowanie NO nie może już przywrócić pełnej żywotności nasion. Czy taką funkcję mógłby pełnić stosunek GSH/GSSG, aktywność reduktazy glutationowej, stopień karbonylacji białek, poziom m-Tyr, zdolność kiełkowania, czy raczej zestaw kilku wskaźników?

Ostatnia publikacja, „*NO treatment of embryos isolated from artificially aged apple seeds modifies the pattern of nitrated and carbonylated proteins*”, opublikowana w *Plant Science*, dotyczyła wpływu NO na profil białek karbonylowanych i nitrowanych oraz na funkcjonowanie



systemów kontroli jakości i degradacji białek. Doktorant wykazał zmiany modyfikacji białek zapasowych i ochronnych, w tym białek LEA, białek szoku cieplnego i innych składników istotnych dla utrzymania żywotności nasion. Wykazał również, że zastosowanie NO zwiększało aktywność proteasomu 20S, odpowiedzialnego za usuwanie białek uszkodzonych oksydacyjnie. Publikację tę oceniam jako szczególnie wartościową, ponieważ rozszerza interpretację działania NO poza klasycznie rozumianą regulację równowagi oksydoredukcyjnej. Uzyskane wyniki wskazują, że tlenek azotu uczestniczy również w regulacji jakości proteomu poprzez wpływ na potranslacyjne modyfikacje białek i mechanizmy ich degradacji. Pozwala to lepiej zrozumieć, w jaki sposób NO może sprzyjać aktywacji metabolizmu, częściowemu znoszeniu spoczynku zarodka oraz uruchamianiu procesów naprawczych. W tym kontekście istotne jest pytanie, czy aktywacja proteasomu 20S stanowi warunek konieczny dla ochronnego działania NO, czy też jest jednym z kilku równolegle uruchamianych mechanizmów. Proszę doktoranta o analizę tego problemu.

Całość uzyskanych wyników wskazuje, że tlenek azotu nie pełni wyłącznie funkcji antyoksydacyjnej. Działa jako regulator wielopoziomowej odpowiedzi komórkowej, obejmującej zmiany ekspresji genów, metabolizmu glutationu, potranslacyjnych modyfikacji białek oraz mechanizmów ich naprawy i degradacji. Działanie to pozostaje jednak ściśle zależne od etapu starzenia. Przy umiarkowanym poziomie uszkodzeń NO może aktywować mechanizmy naprawcze i przyczyniać się do poprawy żywotności zarodków, natomiast przy zaawansowanym starzeniu potencjał naprawczy komórek staje się ograniczony.

Na pozytywną ocenę wszystkich prac zasługuje sposób interpretacji uzyskanych wyników. Autor prowadzi dyskusję w sposób rzeczowy i wyważony, konsekwentnie odnosząc własne obserwacje do aktualnego stanu wiedzy. Formułowane wnioski są logiczne, dobrze uzasadnione i znajdują pełne potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań. Należy podkreślić, że Doktorant unika nadinterpretacji uzyskanych danych, co świadczy o jego dojrzałości naukowej i umiejętności krytycznej analizy rezultatów badań.

Odrębnym zagadnieniem wymagającym dyskusji jest znaczenie dawki tlenu azotu. Efekt biologiczny NO zależy bowiem nie tylko od czasu jego podania, lecz także od osiągniętego stężenia, czasu ekspozycji i warunków aplikacji. Z tego względu proszę Doktoranta o odpowiedź na pytanie, jakie stężenie NO faktycznie osiągnęto w układzie eksperymentalnym oraz czy



analizowano zależność dawka - odpowiedź. Ustalenie optymalnego zakresu stężeń mogłoby mieć kluczowe znaczenie dla rozróżnienia efektu sygnałowego, ochronnego i potencjalnie toksycznego.

Drugim ważnym problemem jest możliwość praktycznego wykorzystania wyników. Badania wykonano na izolowanych zarodkach, natomiast w technologii nasiennej stosuje się całe nasiona, w których okrywy nasienne mogą ograniczać dyfuzję NO i modyfikować jego oddziaływanie. Warto zatem rozważyć, w jakim stopniu uzyskane wyniki można przenieść na zabiegi prowadzone na całych nasionach oraz jakie rozwiązania technologiczne mogłyby znaleźć zastosowanie praktyczne.

Podsumowując, za najważniejsze osiągnięcie rozprawy uważam wykazanie, że ochronne działanie egzogenego tlenu azotu wobec starzejących się nasion ma charakter wielopoziomowy i obejmuje regulację ekspresji genów, metabolizmu glutationu, potranslacyjną modyfikację białek oraz mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę jakości proteomu. Równie istotne jest wykazanie, że skuteczność tego działania zależy od stopnia zaawansowania procesu starzenia i maleje wraz z narastaniem nieodwracalnych uszkodzeń komórkowych. Ponadto, wyniki przedstawione w rozprawie mają znaczącą wartość poznawczą. Poszerzają wiedzę na temat molekularnych i biochemicznych mechanizmów utraty żywotności nasion oraz wskazują, że NO należy traktować jako cząsteczkę sygnałową koordynującą wiele elementów odpowiedzi naprawczej, a nie jedynie jako prosty czynnik antyoksydacyjny. Uzyskane rezultaty wyznaczają także interesujące kierunki dalszych badań dotyczących identyfikacji granic skuteczności NO, optymalizacji jego dawki oraz możliwości zastosowania w ochronie jakości materiału siewnego. Całość badań oceniam wysoko zarówno pod względem koncepcji, zastosowanego warsztatu, jak i wartości uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

Na podstawie analizy przedstawionej rozprawy doktorskiej oraz publikacji stanowiących jej podstawę stwierdzam, że praca doktorska Mgr. Marcina Tymińskiego stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu badawczego dotyczącego molekularnych i biochemicznych mechanizmów ochronnego działania tlenu azotu w procesie starzenia nasion. Uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w rozwój wiedzy z zakresu fizjologii nasion. W związku z powyższym



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

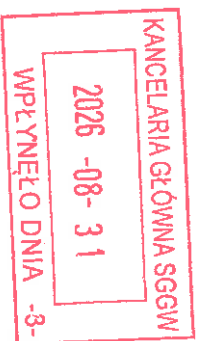
stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jedn. Dz.U. z 2024 r. poz. 1571, z późn. zm.). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z wnioskiem o dopuszczenie Mgr. Marcina Tymińskiego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Biorąc pod uwagę oryginalność uzyskanych wyników, spójność cyklu publikacji, wysoki poziom zastosowanego warsztatu badawczego oraz znaczenie poznawcze rozprawy, wnioskuję również o jej wyróżnienie.


prof. dr hab. Adriana Szmidt-Jaworska

UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 25 05, tel./fax 56 611 47 72
(2570)



UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych
ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń
tel. 56 611 25 05, tel./fax 56 611 47 72
(2570)



www.unik.pl

2026-08-26



R

(00)259007734780128061



(00)259007734780128061

(00)259007734780128061



Poczta Polska

Opłata pobrana _____ zł _____ gr

2026

BON

Biuro Obsługi Nauki
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie
ul. Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa



203332 2026-08-26 02 POLECONA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego Biur
Obsługi Nauki