

Dr hab. Magdalena Żuk, prof. UWr
(magdalena.zuk@uwr.edu.pl)

Wrocław, 30.06.2025r

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Izabeli Perkowskiej
pt. “Elucidating the role and mechanism of regulatory network of genes encoding
dioxygenases in terms of plant adaptation to land conditions ”

(Rola i mechanizm regulacji ekspresji genów kodujących dioksygenazy w adaptacji roślin do wzrostu i rozwoju w warunkach panujących na lądzie)

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Łojkowskiej, oraz dr. Anny
Ihnatowicz (promotor pomocniczy) w Zakładzie Ochrony i Biotechnologii Roślin w ramach Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Pani mgr. Izabela Perkowska w swojej pracy doktorskiej skupia się na zależności pomiędzy genotypami rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, abiotycznymi i biotycznym stresami środowiskowymi, a metabolizmem wtórnym. Szczególną uwagę poświęca metabolitom wtórnym, syntetyzowanym w szlaku fenylopropanoidów, które odgrywają istotną rolę w strategiach adaptacyjnych roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. W swoich badaniach skupia się procesach biosyntezy kumaryny i regulacji szlaku biosyntezy fenylopropanoidów odpowiedzi roślin na stresy biotyczne i abiotyczne.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny praca doktorska to opracowanie będące zestawem 5 wieloautorskich, powiązanych tematycznie, prac naukowych., Pierwsze 3 ukazały się w recenzowanych międzynarodowych czasopismach naukowych (*Molecules* (2021); *International Journal of Molecular Sciences* (2021); *BMC Plant Biology* (2024)). Kolejne dwie przedstawiono w postaci manuskryptów przygotowywanych do publikacji (etap na dzień złożenia pracy). Są to czasopisma o ustalonej renomie, publikujące recenzowane prace opisujące wartościowe wyniki naukowe.

Strona formalna układu rozprawy doktorskiej nie budzi większych zastrzeżeń.

Mgr Izabela Perkowska jest w dwóch już opublikowanych artykułach pierwszym autorem w kolejnej opublikowanej pracy autorem trzecim. W manuskryptach przygotowywanych do publikacji mgr Izabela Perkowska będzie również pierwszym autorem. Z dołączonych do pracy doktorskiej oświadczeń współautorów wynika, że miała znaczący udział nie tylko w wykonaniu opisanych w wymienionych artykułach doświadczeń, ale również w interpretacji uzyskanych wyników oraz w przygotowaniu manuskryptów do druku. Opublikowane i przygotowane do publikacji prace stanowią najważniejszą część rozprawy są spójne tematycznie i w pełni odpowiadają jej tytułowi. Badania wymagały zastosowania szerokiej gamy metod fizjologii roślin, biochemii i biologii molekularnej.



Praca została napisana ,w całości, w języku angielskim co wraz z anglojęzycznymi publikacjami i manuskryptami stanowi spójne opracowanie. Została ona opatrzone Streszczeniem (w języku polskim i angielskim); Wprowadzeniem; Celem pracy; zwięzłym opisem uzyskanych i przedstawionych w kolejnych pracach rezultatów (krótki autorski opis badań doktorantki). W kolejnym rozdziale autorka zamieszcza podsumowanie trafnie wskazując najistotniejsze dokonania przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. Autorka zamieściła również Listę użytych skrótów (tutaj zakradł się maleńki błąd – nie rozwinięto skrótu PDR9). W dalszej kolejności Autorka zamieszcza Spis literatury, Aneks, Wykaz dorobku naukowego (CV). Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i Oświadczenia współautorów stanowią załączniki pracy.

W streszczeniu rozprawy (zarówno wersji polskiej i angielskiej) autorka wspomina „Kumaryny wykazują właściwości chelatujące jony żelaza (Fe)”- w tym miejscu należałoby doprecyzować jakie jony Fe^{2+} / Fe^{3+} – zapis Fe odnosi się do pierwiastka a nie jego formy zjonizowanej.

Stwierdzam, że rozprawa przygotowana przez Pana mgr. Izabelę Perkowską spełnia formalnie wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim. Do rozprawy dołączono oświadczenia, w których Doktorantka i współautorzy artykułów naukowych dokładnie opisują swój udział w przygotowaniu manuskryptów. Nie mam najmniejszych wątpliwości, że wkład Doktorantki w przygotowaniu prac do druku był znaczący i w pełni uzasadnione jest, aby mgr. Izabela Perkowska doktoryzowała się na podstawie tych artykułów. Wszystkie opublikowane prace ukazały się w znanych czasopismach, których redakcje akceptują prace na podstawie recenzji przygotowanych przez pracujących w podobnym temacie naukowców. Nie mam podstaw wątpić iż kolejne artykuły również zostaną podobnie opublikowane. Zarówno temat rozprawy, jak i jej cele mają charakter nowatorski, co również jest ważnym wymogiem stawianym przed rozprawami doktorskimi.

Ocena merytoryczna

W związku z tym, że trzy z dołączonych w ramach pracy doktorskiej manuskryptów zostały już wydane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym nie nastęrczają oceniającemu wiele pracy gdyż zostały już ocenione przez recenzentów kwalifikujących w/w prace do publikacji. Wszystkie te prace dotyczą pierwszego celu badawczego, którym było zbadanie korelacji między poziomem akumulacji kumaryn, zróżnicowaniem genotypowym roślin (naturalne akcesje i mutanty), a oddziaływaniem wybranych czynników stresowych. Badania miały na celu zrozumienie, w jaki sposób *A. thaliana* dostosowuje metabolizm kumaryn w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe.

W pierwszej publikacji:

- Perkowska, I., Siwinska, J., Olry, A., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021a). Identification and Quantification of Coumarins by UHPLC-MS in Arabidopsis thaliana Natural Populations. *Molecules*, 26(6), 1804

opisano naturalną zmienność w zakresie akumulacji wybranych kumaryn (skopoletyny, umbeliferonu i eskuletyny) i ich glikozylowanych form w 28 naturalnych akcesjach



Arabidopsis thaliana. Za pomocą techniki UHPLC-MS wykazano istotne wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie zawartości kumaryn, będące efektem zmian genotypowych i wpływu środowiskowego- warunków wzrostu roślin.

Mam pytanie do procedury ekstrakcji metabolitów :

-tkanki w roztworze 80% metanolu (po wcześniejszej sonikacji) inkubowano w temperaturze 4C przez dobę - jaki był cel tak długiej inkubacji ?

-Dlaczego ekstrakty najpierw podsuszano w 45C a potem koncentratorze ciśnieniowym ?

Te kwestie nie zostały dokładnie wyjaśnione w publikacji.

W kolejnej publikacji

- Perkowska, I., Potrykus, M., Siwinska, J., Siudem, D., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021b). Interplay between coumarin accumulation, iron deficiency and plant resistance to *Dickeya* spp. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6449

wykazano, że akumulacja kumaryn koreluje z niedoborem żelaza w pożywce i jest powiązana z odpornością roślin na *Dickeya* spp. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że kumaryny mogą ułatwiać pozyskiwanie Fe, jak i wspierać indukowane stresem biotycznym mechanizmy obronne roślin.

-W tej pracy opierano się , w ocenie stopnia porażenia / kondycji roślin na opracowanym w laboratorium standaryzowanym systemie oceniania w zakresie od 0 do 5 obejmującym takie parametry jak chloroza, więdnienie, maceracja tkanki – prosiłabym o dokładniejsze omówienie tego systemu (prezentacja zdjęć poglądowych) , jak duża była grupa (na podstawie której opracowano metodę.

Badania opisane w trzeciej publikacji

- Ihnatowicz, A., Siwinska, J., Perkowska, I., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Olry, A. (2024). Genes to specialized metabolites: accumulation of scopoletin, umbelliferone and their glycosides in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 806

skupiały się na powiązaniu dynamiki ekspresji genów z akumulacją wybranych kumaryn w różnych tkankach roślinnych, w wybranych warunkach środowiskowych.

Jak podaje autorka- bazując na wcześniejszej analizie akumulacji kumaryn wybrano trzy genetycznie zróżnicowane, naturalne akcesje *A. thaliana* (Col-0, Est-1 i Tsu-1), dla których wykazano zróżnicowaną akumulację tych związków- rozumiem ,ze wybrano je na podstawie danych przedstawionych w publikacji nr 1 (Perkowska 2021a).

Dlaczego wybrano właśnie te trzy akcesje skoro porównując zawartość skopoletyny – najliczniej reprezentowanej w *A.thaliana* kumaryny należałoby raczej wybrać 1.Bay-0/Br-0 – największa zawartość lub Hog/Van-0 – o jednej z najniższych zawartości kumaryn – bardzo proszę o komentarz w tej kwestii.

Czwarta publikacja, a właściwie przygotowany do publikacji manuskrypt

- Perkowska, I., Olry, A., Barrit, T., Dobek, A., Magot, F., Charles, C., Januchowska, A., Siwinska, J., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2025a) Elucidating the role and regulatory mechanism of *Arabidopsis thaliana* DOXC21-A, its NAT and DOXC21-B in plant adaptation to terrestrial conditions (manuscript in preparation)



dotyczy charakterystyki genów DOXC21-A, jego antysensownego transkryptu (NAT) oraz paralogu DOXC21-B.

-Eksperymenty których wyniki przedstawiono w tym manuskrypcie uzyskano w warunkach hodowli hydroponicznej z dodatkiem PEG – w wcześniejszej pracy (BMC 2024) wykazano istotne różnice w odpowiedzi roślin w warunkach hydroponiki i uprawy w ziemi (mieszkankach podłoża) – dlaczego zatem w tym eksperymencie zdecydowano się na wybranie układu potencjalnie dalszego „warunkom naturalnym” i traktowanie go jako modelu do wyciągania wniosków dotyczących adaptacji roślin do warunków lądowych?

- w innym eksperymencie – warunki suszy – rośliny rosnące w glebie były poddawane stresowi suszy – czy dobrze rozumiem ,ze nie były one podlewane przez 3 tygodnie? – czy nie są to warunki nazbyt ekstremalne? – jak wyglądały rośliny po tak dużym stresie?- czy nie należałoby wykonać eksperymentu „pośredniego” z krótszym okresem suszy np. 10dni – po jakim czasie gleba uległa wysuszeniu (co zainicjowało stres suszy)?

Z kolei stres osmotyczny indukowano stosując mannitol w stężeniu 200mM – czy to są warunki wystarczające ? -czy były widoczne zmiany fenotypowe? Czy zasadne by było zastosowanie silniejszego stresu? – Ja w swoich eksperymentach na lnie stosuję dwa stężenia 250mM i 500mM (to wyższe uważam za ekstremalne – indukujące istotne zahamowanie wzrostu roślin , w niższym zauważam niewielkie zmiany w fenotypie roślin / poziomie chlorofilu).

Ostatnia praca (manuskrypt)

- Perkowska, I., Siwinska, J., Dobek, A., Magot, F., Grosjean, J., Hehn, A., Olry, A., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2025b) Arabidopsis UGT79B9-mediated crosstalk between secondary metabolism, root exudation and plant responses to osmotic stress and iron deficiency (manuscript in preparation)

Skupia się na charakterystyce funkcjonalnej UGT79B9 (AT3G53990), UDP-glukozyltransferazy potencjalnie zaangażowanej w glikozylację związków indukowanych stresem. Jest to bardzo szeroka analiza metabolomiczna ,która niewątpliwie może stanowić istotny przyczynek do badań nad odpowiedzią *A. thaliana* na warunki stresu osmotycznego.

Muszę przyznać ,że dorobek naukowy doktorantki jest bardzo dobry jak na osobę na tym etapie kariery naukowej (udział w 4 publikacjach i 2 kolejne przygotowane do druku). Pani mgr. Izabela Perkowska aż 20 razy prezentowała dokonania zespołu na konferencjach w Polsce i za granicą, była wykonawcą w 6 projektach naukowych (NCN - OPUS, PRELUDIUM, NAWA- PHC Polonium, NCBiR – The Smart Growth Operational Programme). Uczestniczyła również w kilku stażach naukowych w ośrodkach krajowych i zagranicznych (Francja, Holandia), odbyła także szereg szkoleń podnoszących jej kwalifikacje jako naukowca.



WYDZIAŁ BIOTECHNOLOGII

ZAKŁAD BIOCHEMII GENETYCZNEJ

ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 07

biotech.gen@uwr.edu.pl | www.biotech.uni.wroc.pl/zaklad-biochemii-genetycznej

Wniosek końcowy:

Podsumowując, przedstawione w pracy doktorskiej rezultaty i wnioski stanowią ważny wkład w poznanie mechanizmów obronnych i adaptacyjnych roślin. Zarówno sposób przygotowania, jak i zawartość merytoryczna rozprawy pozwalają sądzić, że Pani mgr. Izabela Perkowska jest sprawnym badaczem posiadającym szeroką wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i zawiera oczywisty element nowości naukowej. Pani Izabela przeprowadziła znaczną część prac badawczych w zakresie prezentowanym w niniejszej rozprawie doktorskiej stosując techniki biochemiczne, metody inżynierii genetycznej i biologii molekularnej, co przyniosło wartościowe wyniki. Doktorantka posiadała profesjonalny warsztat naukowy, co czyni ją osobą która może realizować ambitne zadania naukowe.

Podsumowując rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017r poz.1789 ze zm.) w związku z art.179 ust. 1i 2 ustawy z 3.07 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r poz.1669) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr. Izabeli Perkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie Jej stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie powierzonej mi do oceny rozprawy doktorskiej ze względu na unikalną wartość poznawczą i niewątpliwy nowatorski charakter podjętych badań. Nie bez wpływu na moja decyzje pozostaje dotychczasowy dorobek naukowy Kandydatki.

Magdalena Żuk

Dr hab. Magdalena Żuk, prof. UW