

5. Streszczenie w języku polskim

Rozprawa doktorska dotyczy biostymulujących właściwości melatoniny (MEL, N-acetylo-5-metoksytryptamina) aplikowanej do nasion kukurydzy podczas hydrokondycjonowania. Do badań fizjologicznych, biochemicznych, cytologicznych i molekularnych, użyto nasion nietraktowanych – kontrolnych (NT), hydrokondycjonowanych wodą (H) i wodnymi roztworami MEL o stężeniach 50 i 500 μM (odpowiednio HMel 50 i HMel 500). Wykazano, że aplikowanie egzogennej MEL do nasion poprawiało ich kiełkowanie w temperaturach suboptymalnych i stymulowało wzrost osi zarodkowych w warunkach stresu chłodu ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) i po jego ustąpieniu – podczas regeneracji. Do oceny skuteczności kondycjonowania jako metody suplementacji nasion MEL oraz do określenia zawartości MEL i jej potencjalnych metabolitów w nasionach podczas rocznego ich przechowywania zastosowano ilościowe i jakościowe analizy HPLC-MS/MS. Po raz pierwszy, w nasionach NT i H udokumentowano sezonowe wahania stężeń endogennej MEL – zaobserwowano istotny wzrost tej indoloaminy w miesiącach zimowych. Na tej podstawie zasugerowano, że endogenna MEL w nasionach może odgrywać kluczową rolę w sezonowych, niezależnie od warunków środowiskowych, rytmach. Metoda hydrokondycjonowania jest efektywną dla aplikacji MEL do nasion. Poziom tej indoloaminy wzrósł znacznie i proporcjonalnie do zastosowanego stężenia, w nasionach kukurydzy HMel 50 i HMel 500. Zwrócono uwagę, że MEL podczas rocznego przechowywania nasion była stopniowo utleniana, przez co prawdopodobnie chroniła suche tkanki nasion przed stresem oksydacyjnym. Właściwości przeciwutleniające MEL potwierdził niski poziom uszkodzeń oksydacyjnych białek oraz mniejsza ilość produktów peroksydacji lipidów w osiach zarodkowych nasion HMel 50 i HMel 500 eksponowanych na działanie niskiej temperatury ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) podczas kiełkowania. Było to skorelowane ze stymulującym wpływem MEL na podstawowe enzymy antyoksydacyjne: SOD, peroksydazy APX i GSH-PX oraz na GST – enzym detoksykujący. W celu zidentyfikowania zmian w proteomie generowanych przez stosowane metody primingu: H, HMel 50 i HMel 500 – ekstrakty białkowe z zarodków nasion kiełkujących w warunkach optymalnych ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) i w stresie chłodu ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) rozdzielono metodą 2D-PAGE. Następnie uzyskane mapy proteomów porównano (statystycznie i graficznie) za pomocą oprogramowania PDQuest, a charakterystyczne plamy białek przeanalizowano jakościowo technikami spektrometrii mas i zidentyfikowano w bazach danych białek Mascot. Badania

pomogły zidentyfikować białka związane z hydroprimingiem i po raz pierwszy takie, które ulegały ekspresji tylko w obecności MEL. Badania potwierdziły, że odpowiednio dobrany przedsięwzięty zabieg aplikowania MEL do nasion, poprzez modyfikację proteomu zarodka, skutecznie przygotowuje roślinę *a priori* do niekorzystnych warunków środowiskowych. W zarodkach nasion suplementowanych MEL, nawet w optymalnych warunkach, syntetyzowane były dodatkowe białka o działaniu przeciwutleniającym, odtruwającym i przeciwstresowym oraz enzymy intensyfikujące metabolizm energetyczny komórek. Pozytywne efekty kondycjonowania nasion były szczególnie widoczne podczas kiełkowania w suboptymalnych warunkach. Analogiczne zmiany indukowane przez MEL w proteomie zarodków nasion kiełkujących w warunkach stresu chłodu (5 °C) – związane z intensyfikacją oddychania i metabolizmu energetycznego, plastycznością proteomów i wydajnym „obrotem białek”, a co za tym idzie również detoksykacją komórek – są szczególnie istotne dla przetrwania stresu i skutecznej regeneracji uszkodzeń po jego ustąpieniu. Po raz pierwszy udokumentowano, że MEL stymuluje również strategię obronne przed stresem na poziomie cytofizjologicznym, indukując endoreplikację w komórkach bazalnej strefy osi zarodkowych. Podsumowując, MEL aplikowana do nasion kukurydzy poprawia ich jakość, działa biostymulująco i optymalizuje proces kiełkowania zwłaszcza w warunkach stresu chłodu.

Słowa kluczowe: biostymulacja, endoreplikacja, enzymy antyoksydacyjne, hydrokondycjonowanie, kiełkowanie, kukurydza, melatonina, metabolity melatoniny, nasiona, peroksydacja lipidów, proteomika, stres chłodu, stres oksydacyjny, utlenianie białek, zaprawianie nasion, *Zea mays*.

Kotodziejczyk Iarabela

6. Streszczenie w języku angielskim

The PhD dissertation concerns biostimulating properties of melatonin (MEL, N-acetyl-5-methoxytryptamine) applied to the maize seeds by hydroconditioning. For the tests at the physiological, biochemical cytological and molecular levels, control, non-treated seeds (NT), hydroconditioned with water (H) and with aqueous MEL solutions at 50 and 500 μM concentrations (HMel 50 and HMel 500, respectively) were used. It was demonstrated that the application of exogenous MEL to seeds improved their germination under suboptimal temperatures and stimulated the growth of embryonic axes under chilling stress conditions (5 $^{\circ}\text{C}$) and after stress removal, during regeneration. The HPLC-MS/MS quantitative and qualitative analyses were used to evaluate conditioning efficacy as a method for MEL seed supplementation and to determine the content of MEL and of its potential metabolites in the seeds during 1 year following the conditioning. For the first time, in the NT and H seeds, seasonal fluctuations of endogenous MEL concentration were noted and significant increase in this indoleamine in the winter month was observed. This suggests that in seeds endogenous MEL could play a crucial role in seasonal rhythms independently of environmental conditions. The NT seeds and those conditioned with water (H) contained small amount of endogenous MEL. However, the level of this indoleamine increased markedly in maize seeds primed with exogenous MEL and it was correlated with the concentration of MEL applied. It was noted that MEL was metabolized during seed storage by its gradual oxidation, thus it protects dry seeds against oxidative stress. The antioxidant properties of MEL was also confirmed by low level of protein oxidative damage and smaller quantity of lipid peroxidation products in embryonic axes of HMel 50 and HMel 500 seeds exposed to chilling temperature 5 $^{\circ}\text{C}$ during germination. It was correlated with the stimulatory effects of MEL on antioxidant enzymes: SOD, peroxidases: APX and GSH-PX and on GST, a detoxifying enzyme. To identify modifications in proteome of maize seeds caused by all applied conditioning techniques (H, HMel 50, HMel 500), protein extracts of germinated seed embryos in optimal temperature (25 $^{\circ}\text{C}$) and under chilling stress (5 $^{\circ}\text{C}$) were separated by 2D-PAGE. Next, obtained maps of proteomes were compared (statistically and graphically) using PDQuest software, and characteristic spots of proteins were analysed qualitatively by mass-spectrometric techniques and identified in the Mascot protein databases. Research

helped to identify hydropriming-associated proteins and for the first time those which were expressed only in the presence of MEL. Study confirmed that suitably selected pre-sowing treatment with MEL, by embryo proteome modification, *a priori* effectively prepares plants to adverse environmental conditions. In melatonin treated seeds during the initial state of embryos growth, even under optimal conditions, additional antioxidative, detoxifying, anti-stresses proteins and those accelerating energy metabolism were synthesized. Positive effects of seed priming were particularly apparent during germination under suboptimal conditions. Analogous changes induced by MEL in the proteome of seed embryos germinating under cold stress (5 °C) – related to the intensification of respiration and energy metabolism, the proteom plasticity and efficient "protein turnover" and thus also the cells detoxification – are particularly important for the survival of stress and efficient regeneration of damage after it has subsided. Moreover it was showed, for the first time, that MEL induced defence strategies against stress at the cytophysiological level, inducing endoreplication in embryonic axes cells. To sum up, MEL applied to corn seeds improves their quality, has a biostimulating effect and optimizes the germination process, especially under cold stress.

Keywords: antioxidant enzymes; biostimulation; chilling stress; corn; endoreplication; germination, hydroconditioning, lipid peroxidation, maize, melatonin; melatonin metabolites, oxidative stress, protein oxidation, proteomics, seeds, seed priming; *Zea mays*

Katarzyna Isabela