

dr hab. Anetta Kuczyńska, prof. IGR PAN  
Zakład Fenomiki Zbóż  
Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
ul. Strzeszyńska 34  
60-479 Poznań

Poznań, 6 maja 2021 roku

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Iwony Sadura pt.: „Rola brasinosteroidów w procesach aklimatyzacyjnych roślin jęczmienia do niskiej i wysokiej temperatury”**

**wykonanej pod kierunkiem**

**Pani dr hab. inż. Anny Janeczko, prof. Instytutu Fizjologii Roślin PAN**

**w Zakładzie Biologii Rozwoju,  
Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk  
w Krakowie**

Podstawą formalną wykonanej recenzji jest pismo Dyrektora Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 20 kwietnia 2021 roku powierzające mi obowiązki recenzenta w/w rozprawy doktorskiej na podstawie uchwały Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 25 marca 2021 roku.

Praca doktorska mgr Iwony Sadura dotyczy niezwykle ważnych i aktualnych dziś obszarów badań nad wyjaśnieniem roli hormonów roślinnych w kształtowaniu zmienności fenotypowej i tolerancji na czynniki stresowe. Koncentruje się głównie wokół zagadnień związanych z rolą brasinosteroidów w kształtowaniu tolerancji roślin jęczmienia na mróz i wysoką temperaturę. W szczególności praca odpowiada na pytania, czy u jęczmienia poddanego aklimacji (w niskiej i wysokiej temperaturze) deficyt brasinosteroidów i zaburzenia percepcji tych związków: i) zmniejszają tolerancję na mróz i wysoką temperaturę, ii) wpływają na strukturę i funkcjonowanie membran komórkowych, jak również iii) modyfikują gospodarkę hormonalną oraz wydajność fotosyntetyczną roślin w czasie procesu aklimacji?

Zboża narażone są na wiele czynników stresowych, biotycznych i abiotycznych. Wśród tych ostatnich stres temperaturowy uważa się za szczególnie poważny problem w rolnictwie i ogrodnictwie. Stałe ocieplenie klimatu wpływa na intensyfikację parowania obniżając zawartość wody w glebie i zwiększając prawdopodobieństwo pojawienia się suszy. Z kolei chłód może być powodem znaczącego pogorszenia kondycji roślin, zaś mróz prowadzić do obniżki plonu i parametrów jakościowych ziarna. Jęczmień jary należy do gatunków szczególnie wrażliwych, ponieważ już przy niewielkich spadkach temperatury może ulegać poważnym uszkodzeniom.

Brasinosteroidy (BR) stanowią powszechnie występującą grupę steroidowych hormonów roślinnych. Znajdują się w różnych częściach roślin w stężeniach tysiąckrotnie niższych niż inne fitohormony, jednak ze względu na wysoką aktywność biologiczną są ważnymi regulatorami wielu procesów zachodzących w roślinach. Warto podkreślić, że fitohormonom tym przypisuje się również regulację mechanizmów ochronnych u roślin

narażonych na stres biotyczny czy abiotyczny. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że istnieje sieć interakcji molekularnych między metabolizmem BR a sygnalizacją innych fitohormonów, zwiększając szanse rośliny na obronę przed patogenami lub czynnikami wywołującymi stres abiotyczny, tym samym umożliwiając przystosowanie do warunków stresowych i ograniczenie ich negatywnych skutków. Badania związane z metabolizmem BR prowadzone są przez ostatnie lata głównie na modelowych gatunkach roślin, natomiast regulacja i przebieg tych procesów w roślinach uprawnych, w tym w jęczmieniu, są znacznie mniej poznane. Półkarłowe mutanty jęczmienia, wykazujące defekty w sygnalizacji lub biosyntezie BR, mogą służyć jako alternatywa w programach hodowlanych, a także są cennym narzędziem do badania mechanizmu działania tych hormonów w reakcji na warunki stresowe, m.in. stres temperaturowy. Istnieją jednak niespójne doniesienia na temat ich pozytywnej/negatywnej roli w regulacji rozwoju roślin w różnych warunkach środowiska. Stąd podjęcie badań dotyczących wpływu BR i stresu temperaturowego na zmiany metaboliczne u jęczmienia wraz z przesłankami na temat kluczowej roli BR w regulacji wielu procesów morfogenezy i fizjologii roślin stanowi poszerzenie dotychczasowej wiedzy oraz duży wkład w określeniu roli BR w regulacji reakcji roślin na stres temperaturowy.

**W związku z powyższym, stwierdzam, że podjęto badania w ważnej dziedzinie nauki, istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.**

### **Ocena formalna**

Przedłożona do recenzji praca doktorska stanowi podsumowanie badań przeprowadzonych w latach 2016-2020 i ma formę zbioru sześciu, spójnych tematycznie publikacji. Poza wykazem prac naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji do rozprawy doktorskiej, dysertacja zawiera: 39-stronicowe szczegółowe omówienie celu naukowego, uzyskanych wyników, podsumowanie, wnioski oraz spis literatury; 1-stronicowe streszczenia, napisane zgodnie z wymogami, w języku polskim i angielskim; załączniki, którymi są kopie sześciu prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (Publikacje A, B, C, D, E, F) wraz z wymaganymi ustawowo oświadczeniami współautorów publikacji, określające ich indywidualny wkład w powstanie z każdej z sześciu prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego, opatrzone podpisami; ostatnim z załączonych dokumentów jest oświadczenie Pani mgr Iwony Sadura, wraz z jej podpisem, określające udział Doktorantki w powstaniu poszczególnych publikacji. Całość rozprawy doktorskiej jest przygotowana starannie, a jej układ jest klarowny i logiczny.

Jedną z części rozprawy doktorskiej jest 39-stronicowe omówienie celu naukowego, ważniejszych wyników oraz podsumowanie wraz z wnioskami. Ta część pracy została podzielona na następujące rozdziały: „Wprowadzenie”, „Cel pracy”, „Materiał roślinny i schemat eksperymentu”, „Metody badawcze”, „Ważniejsze wyniki”, „Podsumowanie” „Wnioski” i „Literatura”. Wprowadzenie przedstawia aktualny stan wiedzy na temat brasinosteroidów jako regulatorów koniecznych do prawidłowego rozwoju roślin, jak również problematykę związaną ze stresem temperaturowym oraz zjawiskiem aklimacji, podkreślając przy tym te obszary wiedzy, które wymagają uzupełnienia. W rozdziale „Cel pracy”, Pani mgr Iwona Sadura przedstawia przedmiot badań, formułuje cel oraz stawia pytania, których odpowiedzi mają służyć realizacji nakreślonego celu. W rozdziale „Materiał roślinny i schemat eksperymentu” Doktorantka charakteryzuje materiał badawczy będący przedmiotem wszystkich publikacji składających się na rozprawę doktorską. Następnie opisuje ogólny model eksperymentu obowiązujący we wszystkich załączonych pracach oryginalnych (Publikacja B, C, D, E i F), wchodzących w skład jej osiągnięcia naukowego. Pani mgr Iwona Sadura w rozdziale „Metody badawcze” przedstawia spis stosowanych metod i analiz, zaś w rozdziale „Ważniejsze wyniki” opisuje wybrane wyniki konfrontując je z dostępnymi wynikami najnowszych publikacji z danej tematyki badawczej. **Ten rozdział zasługuje na szczególne**

**wyróżnienie, ponieważ napisany jest spójnie i przejrzysto, stanowiąc swoistego rodzaju przewodnik, który wraz z oświadczeniami współautorów publikacji, określającymi ich indywidualny wkład w powstanie z każdej z prac, niezwykle ułatwia recenzentowi rozpoznanie tych aspektów badań, które dotyczą wyłącznie osiągnięcia naukowego Doktorantki i dokonania jego oceny.** W kolejnym rozdziale („Podsumowanie”) Doktorantka zbiera w syntetyczną całość uzyskane wyniki, które kończy krótkim rozdziałem „Wnioski”. Ostatni rozdział stanowi „Literatura” z 78 pozycjami literaturowymi. Niewątpliwym wzbogaceniem tej części pracy jest opatrzenie jej 10 rycinami oraz jedną tabelą.

Całość opisaną powyżej 39-stronicowej części pracy napisana jest poprawnym językiem. Autorka nie ustrzegła się jedynie drobnych błędów interpunkcyjnych, które zostały zaznaczone w przekazanym mi egzemplarzu pracy doktorskiej i którą mogę udostępnić do wglądu. Jednocześnie chciałam zaznaczyć, iż **te drobne uchybienia nie mają wpływu na ogólną ocenę pracy i nie umniejszają w żaden sposób jej wartości naukowej.**

Głównym elementem przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr Iwony Sadura jest spójny tematycznie cykl sześciu publikacji. W skład tego cyklu wchodzi pięć oryginalnych prac badawczych (Publikacja B, C, D, E i F) i jedna praca przeglądowa (Publikacja A), wykonane w Instytucie Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w ramach dwóch projektów: NCN OPUS9 (w którym Doktorantka była wykonawcą) i NCN PRELUDIUM16 (którego Doktorantka jest kierownikiem) oraz we współpracy z Laboratorium Regulatorów Wzrostu Uniwersytetu Plackiego i Czeskiej Akademii Nauk, Ołomuniec, Republika Czeska. Prace opublikowano w latach 2018-2021, w języku angielskim i czasopismach o zasięgu międzynarodowym, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR):

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (2019) wynosi **20,29**, a łączna wartość punktowa wg MEiN (2019) jest równa **620**.

W pięciu pracach Pani mgr Iwona Sadura jest pierwszym autorem, w jednej zaś drugim. Z danych zamieszczonych w oświadczeniach współautorów i Doktorantki wynika, że **wkład jaki wniosła Doktorantka w powstanie każdej z tych prac jest dominujący. Warto podkreślić, że Doktorantka, oprócz tego, że była zaangażowana w realizację większości eksperymentów oraz analizę i interpretację uzyskanych wyników, to w przypadku Publikacji F brała udział w tworzeniu samej koncepcji badań, a sama publikacja przedstawia wyniki kierowanego przez Panią mgr Iwonę Sadura projektu NCN PRELUDIUM16. Na uwagę zasługuje również fakt, że Doktorantka miała wiodący udział w opracowaniu tekstów publikacji. Świadczy to o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Pani mgr Iwony Sadura i jej gotowości do podjęcia dalszej pracy badawczej.** Ponadto, opis dorobku naukowego Doktorantki wskazuje, że oprócz prac wchodzących w skład jej rozprawy doktorskiej, Pani mgr Iwona Sadura jest również współautorem trzech innych publikacji naukowych. Jest kierownikiem projektu NCN PRELUDIUM16 „Brasinosteroidy jako czynniki modyfikujące dynamikę molekularną membran modelowych i membran izolowanych z roślin jęczmienia” oraz wykonawcą w sześciu projektach badawczych finansowanych z różnych źródeł, jak również współautorem pięciu międzynarodowych i krajowych doniesień konferencyjnych. Doktorantka została Laureatem projektu #NCNWinners zorganizowanego przez Krajową Reprezentację Doktorantów. **Wszystko to potwierdza moje przekonanie o dużej aktywności naukowej Pani mgr Iwony Sadura.**

**Stwierdzam, że przyjęta i zaprezentowana forma dysertacji spełnia wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami).**

## Ocena merytoryczna

Celem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej było poznanie roli brasinosteroidów w kształtowaniu tolerancji roślin jęczmienia na mróz i wysoką temperaturę.

Wyznaczony cel pracy Doktorantka realizowała w kilku etapach, a opis przeprowadzonych badań, zastosowanych materiałów i metod badawczych oraz uzyskanych wyników wraz z ich dyskusją streszczony został w rozdziałach pracy doktorskiej 2-8, natomiast przedstawiony został szczegółowo w sześciu pracach (Publikacja A, B, C, D, E i F).

Materiał badawczy (będący także łącznikiem między publikacjami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej) stanowiły rośliny jęczmienia odmiany referencyjnej Bowman oraz linii bliskoizogenicznych, czyli BW084 (linii z zaburzoną biosyntezą BR) i BW312 (linii z zaburzoną percepcją BR). W publikacjach składających się na rozprawę doktorską do analizowanego materiału badawczego włączona została również odmiana Delisa wraz z jej mutantem 522DK (podobnie jak linia BW084 charakteryzuje się zaburzeniami w biosyntezie BR z tą różnicą, iż na późniejszym jej etapie). Mutant ten uzyskany został na drodze niespecyficznego mutagenyzy chemicznej, lecz z uwagi na jego tło genetyczne, które może być bogate w dodatkowe mutacje wpływające m.in. na przebieg innych procesów fizjologicznych, jak Doktorantka zaznaczyła cytując: „do uzyskanych wyników należy się odnosić z pewną ostrożnością i będą one w mniejszym stopniu dyskutowane w niniejszej rozprawie (zwłaszcza w kontekście ekspresji białek)”. Z powyższego powodu, pomimo niewątpliwych korzyści płynących z rozszerzenia badań naukowych o urozmaicony materiał roślinny dla późniejszego wnioskowania, moją ciekawość budzi jakie czynniki kierowały Doktorantką włączając właśnie mutant 522DK do badań?

Ogólny model eksperymentu, obowiązujący we wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wiązał się z rozpoczęciem aklimacji w 5°C (kontynuowanej przez okres 21 dni) bądź 27°C (kontynuowanej przez siedem dni) w stadium rozwojowym roślin jaką była faza trzeciego liścia. Próby do analiz pobierano przed aklimacją oraz w ostatnim dniu aklimacji, bądź na potrzeby niektórych analiz dodatkowo w połowie czasu aklimacji. Wyjątkiem była Publikacja B, gdzie po aklimacji w niskiej i wysokiej temperaturze rośliny dodatkowo potraktowano na potrzeby prowadzonych badań odpowiednio stresem mrozu (-6°C i -8°C) oraz działaniem wysokiej temperatury (38°C i 45°C). W związku z zastosowanym modelem eksperymentu nasunęły mi się pytania:

1. Dodatkowe punkty czasowe to zwiększenie prób do analiz i tym samym zwiększenie kosztów. Niemniej na potrzeby poznawcze profilu zachowania roślin w kontekście stresu abiotycznego i oceny dynamiki zmian w czasie, często stosuje się przynajmniej trzy punkty czasowe, stąd ciekawość moją budzi podejście metodyczne wiążące się z wyborem tych konkretnych punktów z pominięciem najważniejszego punktu czasowego (co znajduje potwierdzenie w wielu danych literaturowych) dla zmian akumulacji fitohormonów w trzecim/czwartym dniu od zaistnienia czynnika stresowego dla obu warunków aklimacji.
2. Jako pierwszy punkt czasowy zbioru próbek do analiz wybrano ostatni dzień wzrostu roślin w warunkach 20°C i do tego punktu odnoszono wyniki uzyskane dla roślin traktowanych stresem temperaturowym. Szlaki sygnałowe fitohormonów i ich interakcje mogą się różnić w zależności od stadium rozwojowego rośliny. Stąd zasadne byłoby prowadzenie odrębnego doświadczenia w warunkach kontrolnych niezależnie od warunków stresowych. Jak wspomniałam wcześniej, zwiększenie materiału roślinnego podnosi pracochłonność i czasochłonność analiz, mimo to czy rozpatrywano poprowadzenie równoległego wariantu kontrolnego w niezmiennych warunkach temperaturowych i pobieranie próbek do analiz w ustalonych punktach czasowych zarówno z roślin poddanych stresowi jak i kontrolnych?

Wykorzystane przez Doktorantkę metody badawcze, na które złożyły się metody analityczne, pomiary i obserwacje, są szczegółowo omówione w każdej z publikacji i nie budzą wątpliwości na temat ich wykorzystania.

Zagadnienia regulacyjnej roli BR w procesach fizjologicznych i molekularnych w aspekcie tolerancji roślin na wysoką i niską temperaturę zostały szeroko omówione w publikacji przeglądowej (Publikacja A). Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest to praca autorstwa jedynie Doktorantki i Pani Promotor, co sugeruje duży nakład pracy (w tym samej Doktorantki) w zebraniu wszelkich najważniejszych informacji i rzetelnym opisanu tak szerokiego tematu, opartego na aktualnej literaturze (86 pozycji literaturowych, w przeważającej liczbie z ostatniej dekady). Każdy z rozdziałów publikacji omawia daną problematykę w kontekście niskiej i wysokiej temperatury oraz kończy się uwagami końcowymi. Zastosowany schemat publikacji wraz z wzbogaceniem jej treści profesjonalnymi rysunkami ułatwiają przyswojenie wiedzy. **Szczególnie doceniam tabelę 1, będącą załącznikiem tej publikacji, streszczającą badania prowadzone przez różne zespoły naukowe (z odnośnikami literaturowymi) na rozmaitych gatunkach roślin z zastosowaniem różnych stresów temperaturowych oraz koncentracji BR wraz z metodami ich aplikacji.**

Niewątpliwie najciekawszą częścią rozprawy doktorskiej jest rozdział 6 „Najważniejsze wyniki”, opracowany z dużą starannością i przedstawiający w zwięzły sposób rezultaty badań wynikające z publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Charakterystyka materiału badawczego pod względem tolerancji na mróz i wysoką temperaturę po aklimacji roślin w 5°C i 27°C (przedstawiona w Publikacji B) pozwoliła na obserwację, że zarówno linie bliskoizogeniczne jak i ich odmiany referencyjne po aklimacji w 5°C charakteryzowały się zbliżoną, wysoką przeżywalnością w temperaturze -6°C. Różnice pojawiły się w temperaturze -8°C, kiedy to Bowman utrzymał wysoką przeżywalność natomiast odmiana Delisa, czy też linie BW084 oraz BW312, charakteryzowały się obniżoną przeżywalnością na mrozie. Z kolei po aklimacji w 27°C linie bliskoizogeniczne wykazały lepszą tolerancję na stres wysokiej temperatury (38°C i 45°C) w porównaniu do ich odmian referencyjnych. W Publikacji B znalazła się również informacja, że w doświadczeniu wstępnym, celem określenia zakresu niskich i wysokich temperatur stosowanych następnie w doświadczeniu głównym, wykorzystano jarą (Kucyk) oraz ozimą (Fridericus) odmianę jęczmienia. Dlaczego wybrano te odmiany (w tym ozimą), a nie np. odmiany referencyjne Bowman i Delisa, będące materiałem badawczym, stanowiąc spójny element rozprawy doktorskiej?

Oznaczenie BR w liściach (Publikacja B) oraz w chloroplastach izolowanych z liści (Publikacja F) umożliwiło Doktorantce stwierdzenie, że w obu tych miejscach homokastasteron i kastasteron występowały w największej ilości, stanowiąc u jęczmienia dominujące BR. Na uwagę zasługuje fakt, że analizy porównawcze między liniami bliskoizogenicznymi a ich odmianami referencyjnymi pozwoliły na wysunięcie wniosku, że „w chloroplastach występują nieznane mechanizmy akumulacji BR, pozwalające na utrzymanie ich niezbędnego poziomu niezależnie od poziomu ogólnego w tkance (i zaburzeń biosyntezy)” co z kolei potwierdziło możliwość (sugerowaną również przez inne doniesienia literaturowe) pełnienia przez BR funkcji np.: regulacji transkrypcji genów chloroplastowych. W przypadku linii BW312 z dysfunkcją receptora BRI1 Doktorantka wykazała zmniejszoną akumulację homokastasteronu co może wskazywać na fakt, że hormon ten staje się ligandem innego białka wiążącego BR niż receptor BRI1, a wniosek ten jest zgodny z innymi doniesieniami literaturowymi sugerującymi możliwość występowania różnych białek wiążących BR. Prowadzone oznaczenia BR doprowadziły Doktorantkę do wniosku, że „zmiany zawartości BR w wyniku aklimacji w 27°C były znacznie mniej intensywne niż te obserwowane w 5°C, co szczególnie dotyczyło tkanki liści”. Analizując tolerancję jęczmienia na mróz Doktorantka

stwierdziła, że odmiana Bowman, zawierająca w liściach najwięcej homokastasteronu, była zarazem najbardziej tolerancyjna na mróz, co potwierdza wcześniejsze przypuszczenia, że homokastasteron może być istotny w aklimacji chłodowej oraz w kształtowaniu tolerancji roślin na mróz. **Co ważne, Pani mgr Iwona Sadura, poza interpretacją własnych wyników badań, prowadzi pogłębioną analizę przybliżającą do wyjaśnienia (sugerując się innymi, dobrze poznanymi mechanizmami jak np.: w oparciu o dobrze poznane niegenomowe efekty odnoszące się do hormonów steroidowych ssaków) regulacji przepuszczalności membran komórkowych.** Takie podejście doprowadziło do wniosku, że większa akumulacja w membranach komórkowych homokastasteronu może przyczynić się większej ich płynności i tym samym większej tolerancji na niską temperaturę.

W kolejnym kroku Doktorantka potwierdziła, że zaburzenia biosyntezy lub dysfunkcja receptora BRI1 skutkowały zmianami zawartości fitohormonów co świadczy o udziale BR w sieci połączeń hormonalnych oraz powiązaniu BR ze szlakami biosyntezy czy sygnalingu auksyn, cytokinin, giberelin, kwasu abscysynowego czy salicylowego. Warto tutaj podkreślić, że analizy wykazały obniżony poziom hormonu stresu (kwasu abscysynowego) u linii BW084 i BW312 rosnących w niskiej temperaturze, co może być dowodem na to, że nie tylko zwiększony poziom akumulacji niektórych giberelin, ale też właśnie obniżenie kwasu abscysynowego może być przyczyną obniżonej tolerancji na mróz. Co niezwykle ważne badania nad współdziałaniem fitohormonów stanowią obecnie istotny dział biologii systemów. Zagadnienia te są jednakże słabo poznane u roślin jednoliściennych, a w szczególności u jęczmienia. Duże zainteresowanie gospodarką hormonalną jęczmienia w kontekście stresów abiotycznych skłaniałyby do poszerzenia badań o pozostałe klasy fitohormonów. Badania nad *Arabidopsis thaliana* i ryżem wskazują, że homeostaza giberelin ma związek ze szlakami sygnalizacji i syntezy innych fitohormonów, w szczególności BR i strigolaktonów. Uwaga ta ma wyłącznie charakter sugestii, ponieważ podjęte badania przez Panią mgr Iwonę Sadurę i przedstawione rezultaty w Publikacji B są bardzo obszerne i niosą wiele nowych informacji. Niemniej w jednym z oświadczeń współautorów, stanowiącym załącznik do tej publikacji, znalazła się informacja o wykonaniu pomiaru zawartości (obok innych fitohormonów) również kwasu jasmonowego. Czy uzyskane wyniki dotyczące tego hormonu okazały się mniej ciekawe i z tego powodu nie znalazły się w publikacji, czy też staną się one częścią innego opracowania?

Ciekawe wyniki dotyczące analiz zmian w membranach komórkowych jęczmienia poddanego aklimacji w 5°C i 27°C (Publikacja E) pozwoliły Doktorantce na przypuszczenie, że BR uczestniczą w zależnej od temperatury regulacji biosyntezy kwasów tłuszczowych lub też sterują procesami odpowiedzialnymi za transport i wbudowywanie kwasów tłuszczowych w membrany. Zmiany w składzie lipidowym membran znajdują odzwierciedlenie w zmianach ich właściwości fizykochemicznych co może częściowo tłumaczyć obniżoną tolerancję roślin z zaburzeniami biosyntezy/percepcji BR na mróz czy zwiększoną tolerancję na wysoką temperaturę. **Warto podkreślić, że w badaniach właściwości fizykochemicznych membran Doktorantka wykorzystwała metodę wagi Langmuira, zaś w Publikacji F metodę Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR) co pozwoliło na udowodnienie wpływu BR na dynamikę molekularną membran chloroplastowych. Podjęte badania stanowią ważną i nową wiedzę na temat oddziaływania BR z membranami i ich stabilizacją.** Brakuje jednak informacji (patrząc na spójność całości pracy) dlaczego do badań EPR wybrano odmianę Delisa i mutanta 522DK, natomiast pominięto odmianę Bowman wraz z wcześniej analizowanymi liniami bliskoizogenicznymi.

Kolejnym etapem badań Doktorantki była analiza wpływu deficytu i zaburzeń percepcji BR na ekspresję wybranych białek: szoku cieplnego (Publikacja C), transportujących wodę - akwaporyny (Publikacja D) oraz pompy protonowej ATPazy (Publikacja D). Konfrontując, w sposób bardzo szczegółowy i wnikliwy, wyniki doświadczeń własnych z najnowszymi

doniesieniami naukowymi w tej tematyce badawczej, Doktorantka wyciągnęła interesujące, w mojej opinii, wnioski: ze względu na to, iż zmiany w akumulacji transkryptu białek szoku cieplnego *HSP* (*HSP90*, *HSP70*, *HSP17* i *HSP18*) w stosunkowo niedużym stopniu były zależne od odmiany, można przyjąć, że taki jest model zależnej od temperatury transkrypcji *HSP* u jęczmienia; ponadto BR są pozytywnymi regulatorami transkrypcji *HSP* u jęczmienia w szerokim zakresie temperatur; i wreszcie, że BR biorą udział także w regulacji samej biosyntezy białek *HSP* za pośrednictwem receptora BRI. **Powyższe wnioski dostarczają nowej wiedzy w aspekcie kierunków zmian ekspresji *HSP* u jęczmienia w czasie aklimacji do różnych temperatur oraz regulacji hormonalnej/roli BR w ekspresji *HSP*.** Z kolei w Publikacji D Doktorantka potwierdza, że BR odgrywają także rolę pozytywnych regulatorów w regulacji transkrypcji H<sup>+</sup>-ATPazy, jak również wydają się być także powiązane z regulacją ekspresji akwaporyny (HvPIP) zarówno na poziomie transkrypcji jak i biosyntezy białka, jednak proces ten zależy w większym stopniu od temperatury i w pewnym stopniu (w aspekcie akumulacji transkryptu) od tła genetycznego.

Uzyskane wyniki okazały się na tyle istotne, że skłoniły Doktorantkę do uzupełnienia prowadzonych badań o przeanalizowanie zaburzeń biosyntezy BR oraz dysfunkcji receptora BR w kontekście zawartości barwników fotosyntetycznych i wydajność PSII w czasie aklimacji jęczmienia. Doktorantka zaobserwowała pewną prawidłowość, a mianowicie wyższa wydajność fotosyntetyczna PSII u 522DK (a także prawdopodobnie u BW084 i BW312) stwierdzona w pomiarach fluorescencji chlorofilu *a*, może wiązać się z półkarłowatością tych rośliny i faktem zwiększonej jedynie koncentracji barwników na jednostkę powierzchni liścia. Jak podkreśla Doktorantka „może to stawiać pod pewnym znakiem zapytania rolę BR jako regulatorów w procesie biosyntezy chlorofilu, mimo tego, iż w wielu pracach, w których stosowano BR egzogennie udowodniono pozytywny wpływ tych związków na poziom barwników fotosyntetycznych zwłaszcza w warunkach stresu”. Doktorantka jednak wysnuwa przypuszczenie, że mechanizm tego zjawiska może być inny i wynikać np. pośrednio z ogólnej ochronnej roli BR w warunkach stresu (co wiąże się następnie z ograniczeniem degradacji chlorofilu). Z powyższych powodów ten wątek naukowy zakończony został wnioskiem: „zwiększenie roli BR w funkcjonowaniu reakcji świetlnych fotosyntezy wymaga dalszych, bardziej szczegółowych badań na poziomie genetycznym i proteomicznym”. Cytowane zdanie skłania mnie to do komentarza, że Doktorantkę w wielu miejscach prowadzonych rozważań cechuje duża ostrożność, a wnioski publikacji z reguły wieńczy ukazanie dużego, nieodkrytego jeszcze pola badawczego, stąd cytowane powyżej stwierdzenie Doktorantki jest bardzo częstym przewijającym się w rozprawie doktorskiej (dla przykładu m.in. z Publikacji B „... will require further and more detailed studies”). Nie jest to oczywiście zarzutem, jedynie moim recenzenckim spostrzeżeniem.

**Uważam, że wszystkie zaplanowane przez Panią mgr Iwonę Sadura etapy badań zostały poprawnie zrealizowane, a zamierzony cel osiągnięty. Zabrakło mi jednak typowych w tego typu pracach wniosków, najczęściej przedstawionych w postaci punktów. Doktorantka zebrała najistotniejsze elementy swoich badań w postaci podsumowania (rozdział 7), po którym znajduje się krótki, trzyzdaniowy rozdział „Wnioski” (rozdział 8), który w moim odczuciu nie spełnia swojej roli, jedynie podkreśla (co też ma znaczenie, ale nie jest twórczym wnioskiem wynikającym z prowadzonych badań) cytując: „brasinosteroidy należy zakwalifikować jako regulatory istotne z punktu widzenia kształtowania tolerancji na stres temperaturowy i warte dalszych pogłębionych badań zwłaszcza w dobie zmian klimatycznych”.**

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już wcześniej poddane merytorycznej ocenie przez międzynarodowych specjalistów w danej dziedzinie wiedzy oraz komitetów redakcyjnych czasopism prezentujących uznany, wysoki poziom naukowy. **Dlatego też wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze wskazują raczej na potrzebę**

**dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, czy też rozwinięcia dyskusji nad niektórymi, bardzo interesującymi w moim odczuciu, wątkami pracy. Nie umniejszają natomiast wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.**

### **Podsumowanie**

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską, zważywszy na duży stopień trudności analizowanych zagadnień, znaczący zakres badań, uzyskane oryginalne wyniki oraz ich staranne udokumentowanie w rozprawie, a także w prestiżowych czasopismach naukowych, **oceniłam bardzo wysoko oraz stwierdzam, że zasługuje na wyróżnienie.** Uważam, że jest ona bardzo dobrym opracowaniem naukowym i wnosi nowe, istotne odkrycia potwierdzające, że brasinosteroidy są ważnymi regulatorami metabolizmu o szerokim spektrum działania u jęczmienia. Co więcej, przeprowadzone badania przybliżyły rolę brasinosteroidów u jęczmienia w szczególności w procesach zachodzących w trakcie aklimacji roślin do niskiej i wysokiej temperatury. Odpowiednie dobranie materiału roślinnego, w postaci linii bliskoizogenicznych z zaburzeniami w biosyntezie i percepcji BR analizowanych na tle odmian referencyjnych, pozwoliło na uzyskanie nowej wiedzy na temat roli tego fitohormonu. Ponadto z uwagi na fakt, że półkarłowe formy jęczmienia, wykazujące defekty w sygnalizacji lub biosyntezie BR mogą być częścią programów hodowlanych mających na celu rozwój nowych odmian jęczmienia, szczególnie istotne są wciąż informacje leżące u podstaw tolerancji na stropy środowiskowe. Stąd uzyskane wyniki mają nie tylko aspekt poznawczy, ale również wymiar praktyczny, hodowlany.

Podsumowując należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska przedstawia prawidłowo przeprowadzony proces badawczy wraz z pogłębioną analizą uzyskanych wyników. Rozprawa zawiera szereg elementów nowości naukowej. Szczególnie należy podkreślić, że udział Doktorantki we wszystkich artykułach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych składając się na znaczący dorobek publikacyjny Doktorantki) był bardzo wysoki, a w szczególności na podkreślenie zasługuje fakt, iż jest Ona pierwszym autorem pięciu spośród sześciu publikacji stanowiących rozprawę doktorską (Publikacja A, B, C, D i F). W pozostałej, szóstej publikacji (Publikacja E) Pani mgr. Iwona Sadura jest drugim autorem.

Godna uznania jest również duża liczba i różnorodność przeprowadzonych przez Panią mgr Iwonę Sadura analiz i doświadczeń oraz bogaty warsztat metodyczny, szczególnie zastosowanie specjalistycznych metod chemicznych (UHPLC-MS), biologii molekularnej (Western Blott, RT-PCR), fizykochemii powierzchni (waga powierzchniowa Langmuira) czy spektroskopii (Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny) podczas realizacji zadań badawczych.

**Niniejszym stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „Rola brasinosteroidów w procesach aklimatyzacyjnych roślin jęczmienia do niskiej i wysokiej temperatury” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie jej Autorki - mgr Iwony Sadura do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie (co uzasadniam w pierwszej części podsumowania) recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.**

Anetta Kuczyńska

dr hab. Anetta Kuczyńska, prof. IGR PAN