

**WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH****ZAKŁAD FIZJOLOGII MOLEKULARNEJ ROŚLIN**ul. Kanonia 6/8
50-328 Wrocławtel. +48 71 375 41 16
fax +48 71 343 41 18

www.uni.wroc.pl

Wrocław, 05.03.2025

dr hab. Katarzyna Kabała, prof. UWr
Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Julii Stachurskiej

pt. „Proces rozhartowania rzepaku – podłoże fizjologiczno-biochemiczne
i konsekwencje dla mrozoodporności roślin”

Informacje o Kandydatce

Pani Julia Stachurska jest absolwentką kierunku biologia Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, tytuł magistra uzyskała w 2020 roku. W tym samym roku podjęła studia doktoranckie w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie w ramach Szkoły Doktorskiej Nauk Przyrodniczych i Rolniczych.

Ocena formalna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zrealizowana została w Instytucie Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN pod opieką merytoryczną promotora prof. dr hab. inż. Anny Janeczko i promotora pomocniczego dr Magdaleny Ryś. Stanowi ona część szerszej tematyki badawczej zespołu kierowanego przez Promotora pracy, dotyczącej mechanizmów warunkujących tolerancję roślin uprawnych na stresy abiotyczne, w tym szczególnie roli regulatorów steroidowych w reakcji roślin na niekorzystne zmiany temperatury.

Rozprawa przygotowana została jako zbiór sześciu spójnych tematycznie wieloautorskich prac naukowych opublikowanych w latach 2022-2024. Cztery z nich, prezentujące oryginalne wyniki badań, zostały opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o łącznym IF równym 19,2 (średni IF publikacji=4,8) i sumarycznej liczbie punktów MNiSW wynoszącej 450. Dwie pozostałe wchodzące w skład cyklu pozycje, stanowiące prace przeglądowe (z tego jedna jest artykułem polskojęzycznym), są cennym wzbogaceniem całego zbioru (parametry łączne to IF=22,5 i 570 pkt).

Przedstawiony cykl publikacji poprzedzony został syntetycznym opisem najważniejszych osiągnięć Doktorantki. Składają się na niego rozdziały Wprowadzenie, Cele pracy, Materiał roślinny oraz schematy eksperymentów, Metody badawcze, Podsumowanie najważniejszych wyników, Wnioski i Spis literatury. Zamieszczono także streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim i angielskim. Do każdej publikacji dołączono oświadczenia wszystkich współautorów o ich udziale w powstaniu pracy. Ponadto, co istotne, zamieszczony został opis wkładu autorskiego Doktorantki w tworzenie każdej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, przedstawiony zbiór prac spełnia formalne kryteria stawiane rozprawom doktorskim.

W przypadku zbioru prac wieloautorskich ważne jest, z punktu widzenia oceny formalnej, określenie istotnego indywidualnego wkładu Doktorantki w ich przygotowanie. Z zamieszczonych opisów zadań wykonanych w ramach poszczególnych prac eksperymentalnych jasno wynika, że Doktorantka zaangażowana była w większość analiz. Doktorantka samodzielnie zakładała doświadczenia, zajmowała się uprawą roślin, przygotowywała materiał roślinny do różnorodnych analiz, wykonywała testy mrozowe. Prowadziła pomiary fluorescencji chlorofilu, własności spektralnych liści i konduktometryczne. Była odpowiedzialna za analizy biochemiczne oraz molekularne (m.in. pomiary akumulacji białek i poziomu transkryptów), wykonując je samodzielnie lub pod odpowiednim nadzorem. Jej udział polegał także na współpracy z pozostałymi autorami. Poza tym brała udział w przygotowaniu każdego manuskryptu. Zajmowała się przede wszystkim przeglądem literatury, opracowaniem statycznym wyników, ich opisem i interpretacją, wizualizacją, sporządzeniem tabel i rycin oraz współuczestniczyła w powstaniu wersji końcowych. W przypadku artykułów przeglądowych na barkach Doktorantki spoczywało przygotowanie całości manuskryptu pod kierunkiem promotora.

Warto podkreślić, że Doktorantka jest pierwszym autorem w pięciu z sześciu prac cyklu oraz dodatkowo autorem korespondencyjnym w dwóch z nich. Informacje powyższe potwierdzają, że mgr Pani Julia Stachurska jest wiodącym autorem wszystkich prac. W mojej ocenie indywidualny wkład Doktorantki bez wątpienia w istotny sposób przyczynił się do powstania cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Nie można w tym miejscu pominąć ważnej roli pozostałych współautorów publikacji, a w szczególności promotora prof. dr hab. inż. Anny Janeczko i promotora pomocniczego dr Magdaleny Ryś, dzięki którym Doktorantka miała sposobność rozwijać się naukowo, doskonalić swój warsztat badawczy oraz nawiązać współpracę z innymi naukowcami i ośrodkami badawczymi. Realizacja rozprawy doktorskiej była bowiem możliwa dzięki zdobyciu przez promotora finansowania w postaci projektu badawczego NCN OPUS nr 2019/35/B/NZ9/02868, w którym Pani Julia Stachurska pełniła funkcję wykonawcy jako doktorant-stypendysta.

Ocena merytoryczna, metodologiczna i ocena dorobku

Hartowanie (czyli aklimacja do niskiej temperatury) i wernalizacja stanowią dwie główne nabyte w toku ewolucji reakcje adaptacyjne roślin, zapewniające im przetrwanie okresu zimy w klimacie umiarkowanym. Obserwowane zmiany klimatyczne, objawiające się globalnym ociepleniem i łagodniejszą temperaturą w porze zimowej, mogą osłabiać mrozoodporność roślin i pogarszać ich przetrwanie. Jest to związane z procesem rozhartowania (czyli deaklimacji) roślin, indukowanym przez pojawiające się zimą okresowe wzrosty temperatury. Regulacja procesu rozhartowania nie jest związana wyłącznie z tolerancją na mróz, ale także z zakończeniem okresu spoczynku i przejściem w fazę wzrostu i rozwoju. Rozhartowanie nie jest wprost odwróceniem hartowania, ale stanowi unikalny proces fizjologiczny uwarunkowany genetycznie. Badania prowadzone na ozimych odmianach zbóż potwierdziły, że jego podłoże genetyczne różni się od tego, które jest charakterystyczne dla hartowania. Kompleksowe analizy epigenetyczne ujawniły zależne od rozhartowania zmiany w metylacji DNA, a także modyfikacje histonów, które mogą prowadzić do przebudowy nukleosomu i przeprogramowania transkryptomu. Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu mechanizmów odpowiedzialnych za rozhartowanie, molekularne podstawy tego procesu nadal w dużej mierze pozostają nieznane.

Badania prowadzone przez Doktorantkę skupiły się na charakterystyce wybranych właściwości biochemicznych i procesów fizjologicznych indukowanych podczas rozhartowania i porównaniu ich u różnych, zwłaszcza ozimych, odmian rzepaku. Rzepak jest jedną z najważniejszych roślin uprawnych w Polsce, głównie ze względu na pozyskiwany z nasion wysokiej jakości olej jadalny, wykorzystywany nie tylko dla celów konsumpcyjnych, ale także energetycznych i przemysłowych. Rzepak stanowi także roślinę miododajną i pastewną, o dużym znaczeniu w pszczelarstwie i hodowli zwierząt. Zatem podjęta przez doktorantkę tematyka, dotycząca wyjaśnienia podłoża zmian indukowanych okresowym wzrostem temperatury podczas zimy (czyli związanych z globalnym ociepleniem), zachodzących u ważnej z gospodarczego punktu widzenia rośliny użytkowej, jest aktualna, a przeprowadzone badania mają potencjał aplikacyjny.

Główne cele rozprawy zostały sformułowane w jasny, choć dość ogólny sposób. W mojej ocenie w rozdziale tym powinny znaleźć się niektóre fragmenty Wprowadzenia, bezpośrednio odnoszące się do celów szczegółowych, wskazanych w poszczególnych publikacjach i wzbogacić go o stawiane hipotezy badawcze. Dotyczy to np. charakterystyki mrozoodporności i wskazania odmian lepiej przystosowanych do temperatury indukującej proces rozhartowania (zamiast szukania odpowiedzi na pytanie, czy odmiany różnią się tolerancją na rozhartowanie).

Z celem koresponduje Wprowadzenie do tematyki pracy. Doktorantka przedstawiła w nim aktualny stan wiedzy na temat zmian zachodzących w roślinach (*Arabidopsis* i rzepaku) podczas procesu rozhartowania na tle obserwowanego w ostatnich latach ocieplenia klimatu oraz wskazała możliwości oceny stopnia rozhartowania roślin i powiązane z nimi sposoby podnoszenia mrozoodporności. Wprowadzenie powinno stanowić tło do podjętych badań, nie rozumiem zatem, dlaczego wplecione zostały w niego odniesienia do celów/wyników rozprawy doktorskiej, skoro opisowi tych aspektów służą kolejne rozdziały.

Użyty materiał roślinny oraz schematy eksperymentów opisane zostały jasno i szczegółowo, chociaż Doktorantka nie ustrzegła się przed drobnymi nieścisłościami (np. wskazała 5 odmian jako dostępnych w rejestrze COBORU, a wymieniła 6; wg mnie opis schematu pierwszego doświadczenia nie pokrywa się z rysunkiem pod względem liczby dni w kolejnych etapach wzrostu i pomiarów). Przy okazji przeglądania opisu metod badawczych nasunęło mi się pytanie, czy użyte Western blotting i immunoblotting to dwie różne metody?

Podsumowanie najważniejszych wyników jest obszernym opisem odnoszącym się do danych opublikowanych w czterech pracach eksperymentalnych cyklu. Tu pozwolę sobie na małą dygresję. Z punktu widzenia recenzenta, znacznym ułatwieniem w analizie prezentowanych wyników byłoby wyodrębnienie odmiany jarej od pozostałych ozimych odmian rzepaku na zbiorczych wykresach/rysunkach.

Doktorantka konsekwentnie, zgodnie ze sformułowanymi celami rozprawy, omawia poszczególne etapy doświadczeń i uzyskane wyniki. Pozwoliły one na:

I) Scharakteryzowanie procesu rozhartowania rzepaku na poziomie biochemicznym, fizjologicznym, a także molekularnym. Wykazano, że hartowanie:

1. obniża mrozoodporność wszystkich odmian rzepaku
2. może powodować zmiany poziomu brasinosteroidów, w tym obniżenie zawartości (zidentyfikowano 6 związków z tej grupy u rzepaku); wyższa zawartość BR była charakterystyczna dla odmian o większej mrozoodporności

3. utrzymuje niski poziom ekspresji genu *BRI1* kodującego błonowy receptor brasinosteroidów u odmian o wyższej mrozoodporności
4. wpływa na proces fotosyntezy, szczególnie na parametry fazy świetlnej; zwiększa wydajność fotosystemu II

(*Stachurska et al. 2022. International Journal of Molecular Sciences 23, 5224. IF=4,9; 140 pkt*)

5. moduluje podstawową równowagę hormonalną; zwiększa zawartość hormonów odpowiedzialnych za wzrost i rozwój roślin (giberelin i cytokinin, a także pochodnej auksyny - kwasu indolilo-3-karboksylowego) i istotnie obniża poziom kwasu abscysynowego (a także wpływa na zawartość kwasu jasmonowego i jego prekursora OPDA); wskazano poziom ABA lub stosunek giberelin do ABA jako parametr do monitorowania procesu rozhartowania u rzepaku
6. powoduje w większości przypadków spadek poziomu białek szoku cieplnego HSP70 i HSP90

(*Stachurska et al. 2023. Agriculture 13, 641. IF=3,3; 100 pkt*)

7. zmienia właściwości fizyko-chemiczne błon chloroplastowych; zmniejsza ich płynność i obniża stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych 18:3/18:2 w wyizolowanych frakcjach fosfolipidów i galaktolipidów
8. zmniejsza poziom tokoferoli w chloroplastach, co może osłabiać strukturę błony
9. zwiększa zawartości beta-karotenu w błonach chloroplastowych u niektórych odmian ozimych

(*Rys et al. 2024. Plant Physiology and Biochemistry 214, 108961. IF=6,1; 70 pkt*)

10. powoduje wzrost akumulacji białka receptorowego *BRI1*
11. odwraca wywołane przez hartowanie zmiany w ekspresji genów związanych ze szlakiem BR; powoduje obniżenie poziomu indukowanego przez BR *COR14* i wzrost poziomu uczestniczącego w sygnalizacji BR *SERK1*

(*Stachurska et al. 2024. International Journal of Molecular Sciences 25, 6010. IF=4,9; 140 pkt*)

II) Wskazanie nowych nieinwazyjnych metod i parametrów użytecznych w identyfikacji stanu rozhartowania roślin. W wyniku przeprowadzonych analiz zaliczono do nich:

1. pomiary opóźnionej fluorescencji chlorofilu (DF) i parametr I_1
2. pomiary odbiciowości modulowanej (MR820) i parametr MR_{max}

(*Stachurska et al. 2022*)

3. pomiary własności spektralnych liści i parametry refleksji np. ARI
4. wstępnie także pomiary wartości netto fotosyntezy (P_N)

(*Stachurska et al. 2024*)

III) Potwierdzenie możliwości polepszenia (przynajmniej w pewnym zakresie) mrozoodporności rzepaku po rozhartowaniu poprzez aplikowanie regulatorów steroidowych, w tym naturalnych brasinosteroidów i ich analogów

(*Stachurska et al. 2024*)

Opisane najważniejsze osiągnięcia zaprezentowano na zbiorczym schemacie, wskazując zmiany zachodzące w wyniku indukcji procesu hartowania, a następnie rozhartowania rzepaku i zestawiając je z wynikami wcześniejszych prac w tym obszarze badawczym. Jest to doskonałe podsumowanie, które jednocześnie, w świetle

przycoczonych przez Doktorantkę faktów, ukazuje zasadność badań podjętych w ramach rozprawy doktorskiej.

Wszystkie prace eksperymentalne składające się na rozprawę doktorską prezentują bardzo dobry poziom naukowy, tworzą logiczną całość, a uzyskane wyniki są wartościowe i w znacznym stopniu wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat mechanizmów procesu rozhartowania roślin i jego konsekwencji, a także dostarczają istotnych informacji odnośnie praktycznych możliwości monitorowania stanu rozhartowania. W mojej ocenie, zarówno obiekt badawczy jak i wykorzystane w rozprawie metody dobrane zostały właściwie. Szeroki zakres badań składających się na rozprawę wymagał od Doktorantki poznania i opanowania różnorodnych technik badawczych. Dwa artykuły przeglądowe wchodzące w skład cyklu, dotyczące charakterystyki procesu rozhartowania, są doskonałym uzupełnieniem całości rozprawy. Świadczą o dogłębnej znajomości podjętej tematyki badawczej i bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki do realizowanych zadań badawczych.

W rozprawie zdecydowanie zabrakło sformułowania, w formie kilku punktów, najwartościowszych wyników/osiągnięć pracy. Rozdział Wnioski stanowi bardzo ogólne podsumowanie, w którym trudno dopatrzyć się naukowych treści. Warto było w tym rozdziale podkreślić nowatorski charakter osiągnięć pracy, „pochwalić się”, co nowego wnoszą uzyskane wyniki do wiedzy w badanej dziedzinie, czego dokonano po raz pierwszy itp. Zabrakło np. wyraźnego wskazania konkretnych odmian rzepaku, o korzystnych cechach, jako sugerowanych do uprawy w dobie obserwowanych zmian klimatycznych czy podkreślenia istotnych różnic między oziminami a odmianą jarą. W związku z tym proszę Doktorantkę o sformułowanie i przedstawianie najważniejszych wniosków rozprawy podczas publicznej obrony.

Rozważając zbiór prac składających się na rozprawę jako spójną całość, proszę Doktorantkę o odniesienie się do kilku kwestii:

1. Jednym z ważnych i nowatorskich aspektów rozprawy są badania dotyczące zmian poziomu brasinosteroidów i powiązanie rozhartowania ze szlakiem sygnałowym tej grupy hormonów roślinnych. Wykazano, że podczas rozhartowania poziom białka receptora BRI1 wyraźnie się zwiększa, podczas gdy ekspresja genu *BRI1* utrzymuje się raczej na niskim poziomie. W jaki sposób można wytłumaczyć obserwowane rozbieżności?

Kontynuując tę tematykę, dlaczego ograniczono się do analizy samego receptora i nie uwzględniono w badaniach koreceptora BAK1, skoro interakcja między tymi dwoma białkami błonowymi jest konieczna do transdukcji sygnału?

U *Arabidopsis* oprócz BRI1 zidentyfikowano białka BRL pełniące funkcje receptorów BR w tkankach przewodzących. Czy dostępne są informacje na temat ich homologów u rzepaku?

Na jakiej podstawie wybrano epibrasinolid i homokastasteron spośród naturalnych BR do badania wpływu regulatorów steroidowych jako czynników wzmacniających mrozoodporność podczas rozhartowania?

2. Badania prowadzone w ramach rozprawy wykazały, że rozhartowanie istotnie obniża poziom ABA, który może stanowić parametr służący do monitorowania tego procesu. Natomiast Rapacz et al. (2002) zaobserwowali odwrotną zależność, czyli wzrost poziomu ABA podczas rozhartowania rzepaku. Co jest przyczyną stwierdzonych rozbieżności? Czy w związku z tym poziom ABA uznać jako wskaźnik informujący o rozhartowaniu i

na ile ten parametr jest uniwersalny w badaniach dotyczących innych gatunków roślin, zwłaszcza uprawnych?

3. Analizy poziomu transkryptów (*BRI1* oraz *COR14*, *SERK1* i *SERK2*) przeprowadzono w oparciu o wyniki reakcji qPCR. Warunki amplifikacji nie zostały opisane w publikacjach, odwołano się do dwóch wcześniejszych prac, Jurczyk et al. 2012 i 2021, dotyczących innych gatunków roślin, czyli *Festuca pratensis* i *Lolium perenne*, a także generalnie do innych genów (poza *COR14*). W jaki sposób optymalizowano warunki reakcji dla genów rzepaku?

Wyniki qPCR w znacznej mierze zależą od prawidłowo dobranego genu referencyjnego. Co zdecydowało o tym, że w badaniach wykorzystano gen kodujący aktynę? Zazwyczaj zaleca się stosowanie więcej niż jednego genu jako kontroli. Czy testowano inne geny referencyjne? Warto pamiętać, że pomimo istotności wykazanej testem statystycznym, należy zachować ostrożność w interpretacji niedużych zmian poziomu ekspresji w odniesieniu do kontroli, zwłaszcza w przypadku stosowania jednego genu referencyjnego.

Podejmując dyskusję z Doktorantką, chciałabym poznać Jej opinię w kwestii, czy otrzymane w ramach rozprawy wyniki można powiązać z funkcjonującą u roślin „pamięcią” indukowaną stresem (tzw. stress memory, w przypadku chłodu cold stress memory). Rośliny pomimo braku układu nerwowego zdolne są do monitorowania, zapamiętywania i przewidywania zmian w środowisku na poziomie komórkowym. Mechanizmy tejże pamięci obejmują wywołane stresem zmiany na poziomie molekularnym, biochemicznym, fizjologicznym i morfologicznym, które utrzymują się po zakończeniu ekspozycji. Czy analizowane parametry mogą funkcjonować jako elementy takiej pamięci?

Doktorantka nie ustrzegła się przed drobnymi niedopatrzeniami i pomyłkami, które w żaden sposób nie wpływają na wysoką ocenę merytoryczną rozprawy. Proszę jednak o wyjaśnienie, czym różni się RuBisCO od RuBPCO oraz czym jest oksydowana forma auksyny (wg mojej wiedzy oksydowanie to proces pokrywania powierzchni metali cienką warstwą ich tlenków).

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, na którą składa się spójny tematycznie zbiór sześciu opublikowanych artykułów naukowych, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka wykazała się zarówno umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej jak i ogólną wiedzą teoretyczną w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Rozprawa spełnia tym samym warunki określone w artykule 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 poz. 1789). W związku z powyższym, wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie o dopuszczenie mgr Julii Stachurskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Katarzyna Kobon