

Prof. dr hab. Elżbieta Kuźniak-Gębarowska
Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Julii Stachurskiej pt.
„Proces rozhartowania rzepaku – podłoże fizjologiczno-biochemiczne i konsekwencje
dla mrozoodporności roślin”

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie z dnia 20.12.2024.

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Rozprawa doktorska Julii Stachurskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Janeczko oraz promotora pomocniczego dr Magdaleny Ryś w Zakładzie Biologii Rozwoju Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Rozprawa stanowi spójny tematycznie cykl sześciu publikacji stanowiących podsumowanie badań doktorantki dotyczących mrozoodporności rzepaku (*Brassica napus* L.), które koncentrują się na zjawisku rozhartowania (deaklimacji) roślin w kontekście zmian klimatycznych. Przedmiotem analizy są fizjologiczno-biochemiczne mechanizmy tego procesu, wpływ rozhartowania na mrozoodporność oraz możliwości monitorowania tego stanu i potencjalne strategie zaradcze.

W związku z postępującymi zmianami klimatu, w okresie jesienno-zimowym coraz częściej występują okresy z podwyższoną temperaturą, które zaburzają naturalny proces hartowania ozimych roślin uprawnych. Prowadzi to do rozhartowania roślin i obniżenia ich mrozoodporności, przez co zwiększa się ryzyko uszkodzeń w przypadku nagłych mrozów i związanych z tym strat ekonomicznych. Problem dotyczy głównie odmian ozimych, które z uwagi na wyższe plony są częściej uprawiane w Polsce niż odmiany jare. Zjawisko rozhartowania, rozumiane jako odwrócenie zmian fizjologiczno-biochemicznych, które zachodzą w roślinach w procesie hartowania do niskich temperatur, było przedmiotem badań prowadzonych zarówno na gatunku modelowym *Arabidopsis thaliana* L. Heyn., jak i roślinach ważnych gospodarczo, takich jak jęczmień, pszenica, pszenżyto i rzepak. Jest ono jednak znacznie słabiej poznane niż zmiany fizjologiczno-biochemiczne zachodzące w roślinach w czasie hartowania do niskich temperatur.

Doktorantka analizowała zmiany fizjologiczne, biochemiczne i molekularne, w tym aktywność fazy jasnej fotosyntezy, rolę hormonów roślinnych, głównie brasinosteroidów, białek szoku cieplnego, barwników asymilacyjnych i tokoferoli oraz właściwości błon chloroplastów w procesie hartowania i rozhartowania roślin rzepaku. Podjęła też próbę identyfikacji

markerów rozhartowania za pomocą nieinwazyjnych metod pomiarowych takich jak analiza fluorescencji chlorofilu i pomiar własności spektralnych liści oraz wykorzystania brasinosteroidów do przeciwdziałania negatywnym skutkom obniżenia mrozoodporności roślin w wyniku rozhartowania.

Poznanie fizjologiczno-biochemicznych procesów zachodzących w roślinach podczas rozhartowania ma znaczenie dla pogłębienia wiedzy na temat złożonych uwarunkowań tolerancji roślin na stresy środowiskowe, w szczególności stres temperaturowy. W kontekście zmieniającego się klimatu i jego wpływu na rolnictwo badania nad rozhartowaniem roślin mają istotne znaczenie praktyczne dla opracowania skutecznych strategii minimalizujących jego negatywne skutki dla upraw roślin ważnych gospodarczo. Z tego względu tematykę rozprawy doktorskiej uważam za aktualną i ważną dla badań podstawowych oraz aplikacyjnych.

Ogólna ocena formalna

Rozprawa doktorska mgr Julii Stachurskiej składa się z sześciu wieloautorskich artykułów naukowych (opisanych A-F) opublikowanych w latach 2022-2024, w tym czterech artykułów eksperymentalnych i dwóch prac przeglądowych. Pięć prac ukazało się w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports, tj. *Agriculture* (1 artykuł), *Agronomy* (1 artykuł), *International Journal of Molecular Sciences* (2 artykuły) i *Plant Physiology and Biochemistry* (1 artykuł). Jedna praca przeglądowa została opublikowana w czasopiśmie popularyzującym wiedzę przyrodniczą (*Kosmos*). Czasopisma naukowe o współczynniku wpływu IF w zakresie 3,3-6,1 mieszczą się w pierwszym kwartyle (Q1) w dziedzinie Plant Sciences (*Agronomy*, *Plant Physiology and Biochemistry*), *Agronomy (Agriculture)* i *Biochemistry and Molecular Biology (International Journal of Molecular Sciences)*. Sumaryczny IF artykułów składających się na rozprawę doktorską, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 22,5, sumaryczna liczba punktów MNiSW – 550, a liczba cytowań (bez autocytowań) na podstawie Web of Science – 8 (dane z dnia 20.02.2025).

Wszystkie prace powstały w ramach projektu NCN Opus nr 2019/35/B/NZ9/02868 kierowanego przez prof. dr hab. Annę Janeczko, w którym doktorantka była stypendystką. W pięciu pracach (A-B i D-F) Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej (C) – drugim. W czterech pracach (B, D, E, F) Doktorantka jest jedynym lub jednym z dwóch autorów korespondujących. Oświadczenia współautorów i Doktorantki oraz informacje dostępne w publikacjach w sekcji „Author Contributions” wskazują na istotny wkład mgr Julii Stachurskiej w powstanie artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej na etapie prowadzenia badań, przetwarzania, interpretacji i syntezy danych oraz przygotowania manuskryptów.

Poza kopiami publikacji i oświadczeniami współautorów o wkładzie autorskim w ich powstaniu oraz streszczeniu w języku polskim i angielskim, rozprawa zawiera także przewodnik – komentarz do cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Opracowanie jest bardzo obszerne, liczy 46 stron i obejmuje następujące części: Wprowadzenie, Cele pracy, Materiał roślinny oraz schematy eksperymentów, Metody badawcze, Podsumowanie najważniejszych wyników, Wnioski i Spis literatury (58 pozycji).

Opracowanie zostało przygotowane bardzo starannie zarówno pod względem koncepcyjnym, jak i edytorskim. Wprowadzenie dobrze nakreśla problem badawczy i jego znaczenie na tle aktualnego stanu badań nad mrozoodpornością roślin po rozhartowaniu. Ogólne cele pracy zostały jasno określone. Tabele i ryciny w rozdziałach „Materiał roślinny oraz schematy eksperymentów” i „Metody badawcze” dobrze dokumentują przeprowadzone badania. Na podkreślenie zasługuje opracowanie części „Podsumowanie najważniejszych wyników”, które nie stanowi opisu poszczególnych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej,

a przedstawia wyniki pogrupowane według najważniejszych zagadnień, tj. mrozoodporności rzepaku po rozhartowaniu, roli hormonów, białek szoku termicznego i zmian właściwości błon chloroplastów w tym procesie oraz wykrywania stanu rozhartowania roślin metodami nieinwazyjnymi. Opis wyników dobrze uzupełnia 1 tabela i 14 rycin przygotowanych na potrzeby tego opracowania, a zwłaszcza ryc. 20 stanowiąca syntetyczne podsumowanie osiągnięć Doktorantki i wyników innych autorów badających proces hartowania/rozhartowania na rzepaku. Moje zastrzeżenia formalne budzi rozdział „Wnioski”. Jego treść nie odpowiada tytułowi. Rozdział ten stanowi opinię Doktorantki na temat strategii ochrony roślin opartej na wiedzy o mechanizmach rozhartowania i wykorzystaniu nieinwazyjnych metod monitorowania stanu upraw.

Ocena merytoryczna

W skład rozprawy doktorskiej mgr Julii Stachurskiej wchodzi następujące publikacje:

- A. Stachurska, J., Rys, M., Pocięcha, E., Kalaji, H.M., Dąbrowski, P., Oklestkova, J., Jurczyk, B., Janeczko, A. 2022. Deacclimation-Induced Changes of Photosynthetic Efficiency, Brassinosteroid Homeostasis and *BR1* Expression in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.)—Relation to Frost Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5224.
- B. Stachurska, J., Sadura, I., Rys, M., Dziurka, M., Janeczko, A. 2023. Insight into Hormonal Homeostasis and the Accumulation of Selected Heat Shock Proteins in Cold Acclimated and Deacclimated Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Agriculture* 13, 641.
- C. Rys M., Stachurska J., Rudolphi-Szydło E., Dziurka M., Waligórski P., Filek M., Janeczko A. 2024. Does deacclimation reverse the changes in structural/physicochemical properties of the chloroplast membranes that are induced by cold acclimation in oilseed rape? *Plant Physiology and Biochemistry*, 214, 108961
- D. Stachurska J., Sadura I., Jurczyk B., Rudolphi-Szydło E., Dyba B., Pocięcha E., Ostrowska A., Rys M., Kvasnica M., Oklestkova J., Janeczko A. 2024. Cold acclimation and deacclimation of winter oilseed rape – special attention being paid to role of brassinosteroids. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 6010.
- E. Stachurska, J.; Janeczko, A. 2024. Physiological and Biochemical Background of Deacclimation in Plants, with Special Attention Being Paid to Crops: A Minireview. *Agronomy* 14, 419.
- F. Stachurska J., Janeczko, A. 2024. Zjawisko hartowania i rozhartowania roślin w kontekście zmian klimatu. *Kosmos*, 73 (1), 37–46.

Publikacje stanowiące rozprawę doktorską pani mgr Julii Stachurskiej zostały już poddane weryfikacji naukowej przez recenzentów w procesie publikowania, dlatego moja opinia koncentruje się na ocenie spójności zbioru prac stanowiących rozprawę doktorską i oryginalności wyników oraz umiejętności Doktorantki do przedstawienia zagadnień objętych rozprawą.

Cztery oryginalne prace doświadczalne dokumentujące badania Doktorantki stanowią spójny zestaw wyników obejmujący:

1. Określenie wpływu rozhartowania na mrozoodporność rzepaku (A).
2. Analizę fizjologiczno-biochemicznego podłoża procesu rozhartowania na podstawie zmian w gospodarce hormonalnej (B), akumulacji białek HSP (B), właściwościach błon

określanych w oparciu o skład lipidowy, zawartość karotenoidów i tokoferoli oraz płynność błon chloroplastowych (C).

3. Ocenę przydatności nieinwazyjnych metod pomiarowych takich jak: pomiary fluorescencji chlorofilu (A) i własności spektralnych liści (D) do monitorowania rozhartowania.
4. Weryfikację możliwości zastosowania regulatorów wzrostu, głównie brasinosteroidów, do poprawy mrozoodporności rzepaku po jego rozhartowaniu (D).

Publikacje doświadczalne wchodzące w skład rozprawy znacząco poszerzają wiedzę na temat fizjologiczno-metabolicznych aspektów procesu rozhartowania roślin rzepaku. Wyniki zostały skrupulatnie opisane, przeanalizowane z użyciem odpowiednich testów statystycznych i dobrze opracowane graficznie. Ich dyskusja z danymi literaturowymi jest dojrzała i wieloaspektowa, co wskazuje na dobre merytoryczne przygotowanie Doktorantki. Do najważniejszych dokonań Doktorantki decydujących o wartości merytorycznej rozprawy zaliczam:

1. Potwierdzenie różnic odmianowych w tolerancji na rozhartowanie i wykazanie, że wyższa tolerancja niektórych odmian rzepaku (np. Rokas) na rozhartowanie może zależeć od utrzymania zmian metabolicznych zaindukowanych w czasie hartowania chłodem.
2. Stwierdzenie, że rozhartowanie prowadzi do odwrócenia zmian fizjologiczno-biochemicznych indukowanych hartowaniem i powoduje:
 - a. Przesunięcie równowagi hormonalnej w kierunku akumulacji hormonów odpowiedzialnych za wzrost i rozwój (głównie giberelin i *cis*-zeatyny) i obniżenia stężenia hormonu stresu – kwasu abscysynowego (ABA). Towarzyszy temu wzrost stężenia kwasu indolilo-3-karboksylowego, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w roślinach rzepaku i podobnie jak obniżenie stężenia ABA, jest rozważany jako potencjalny marker rozhartowania.
 - b. Akumulację białka receptorowego brasinosteroidów (BRI1), która może wskazywać na aktywację sygnalizacji w kierunku stymulacji wzrostu, co jest niekorzystne z punktu widzenia mrozoodporności.
 - c. Obniżenie zawartości białek HSP70 cyt. i HSP90, któremu u odmian ozimych towarzyszy wzrost stężenia HSP70 chl., co może przyczynić się do lepszej ochrony białek aparatu fotosyntetycznego w czasie rozhartowania w porównaniu do odmian jarych.
 - d. Spadek stosunku kwasów tłuszczowych 18:3/18:2 membran chloroplastowych i obniżenie ich płynności.
 - e. Zmniejszenie akumulacji związków o działaniu ochronnym/antyoksydacyjnym (tokoferoli) w błonach chloroplastowych i Intensyfikację reakcji fazy jasnej i ciemnej fotosyntezy.
3. Wykazanie, że stan rozhartowania roślin rzepaku można monitorować za pomocą szybkich, nieinwazyjnych pomiarów fizjologicznych, takich jak: pomiary fluorescencji chlorofilu (bezpośredniej, opóźnionej i odbiciowości modulowanej), pomiar własności spektralnych roślin, parametr ARI1 (Anthocyanin Reflectance Index), co umożliwia wczesne wykrycie rozhartowania i podjęcie odpowiednich działań ochronnych.

Wyniki zostały uzyskane przy użyciu szerokiego wachlarza metod i technik badawczych, począwszy od klasycznych metod fizjologicznych (np. pomiar fluorescencji chlorofilu a i wymiany gazowej, konduktometria), poprzez metody biologii molekularnej (qPCR, western blotting, immunoblotting), aż po wyspecjalizowane techniki analityczne (UHPLC-MS/MS, GC) i metody modelowania membran komórkowych (technika monowarstw Langmuira).

Uzupełnienie prac doświadczalnych stanowią dwie publikacje przeglądowe (E-F), z których na szczególną uwagę zasługuje publikacja E. Doktorantka nie tylko podsumowała w niej dotychczasową wiedzę na temat procesu rozhartowania w kontekście zmian klimatycznych, ale przedstawiła wyniki badań własnych konfrontując je z wynikami wcześniejszych prac na rzepaku i innych gatunkach o dużym znaczeniu gospodarczym. Dzięki temu praca może przyczynić się do rozwoju kolejnych koncepcji badawczych. Z satysfakcją odnotowuję, że w publikacjach przeglądowych Doktorantka uczestniczyła w tworzeniu koncepcji pracy.

W kontekście uzyskanych wyników i ich dyskusji proszę Doktorantkę o komentarz do następujących uwag i pytań:

1. Jak sprawdzano czystość frakcji chloroplastów rzepaku? Nie znalazłam takiej informacji w publikacji C oraz w opisie metody otrzymywania chloroplastów jęczmienia (Sadura i wsp., 2021), do której autorzy się odwołują. Czy poza obserwacją mikroskopową chloroplastów rzepaku wykonano dodatkowe analizy pozwalające na ocenę zanieczyszczenia frakcji chloroplastowej innymi organellami? Takie dane są ważne dla poprawności wnioskowania o zmianach zachodzących w błonach chloroplastów podczas hartowania/rozhartowania roślin.
2. Jak wyliczano stosunek gibereliny/ABA i auksyny+cytokininy+gibereliny/ABA+JA? Dlaczego w przypadku relacji z ABA stosunek odniesiono tylko do GA3, dominującej pod względem ilościowym w puli giberelin, a dla relacji z ABA i JA uwzględniono GA3, GA4, GA6 i GA7 (publikacja B, rys. 8)?
3. W kompleksowej ocenie wyników pewną trudność powoduje brak konsekwencji w doborze odmian rzepaku. Na podstawie badań mrozoodporności z 10 odmian rzepaku do dalszych, szczegółowych analiz wytypowano cztery, tj. Bojan, President, Rokas i Feliks (publikacja A), ale niektóre badania (publikacja D) prowadzono tylko na dwóch odmianach (wpływ brasinosteroidów i ich analogów na mrozoodporność rzepaku – odmiany President i Pantheon lub jednej (wpływ brasinosteroidów na przepuszczalność błon – odmiana President). Dodatkowo badania prowadzono na ozimych odmianach mieszańcowych (President i Pantheon) i populacyjnych (Bojan, Rokas). Udział odmian mieszańcowych w uprawie rzepaku systematycznie się zwiększa ze względu na ich wyższy plon i odporność na choroby i dostępność odmian populacyjnych będzie coraz mniejsza. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie (poza mrozoodpornością) wybierano odmiany rzepaku do badań, dlaczego wykorzystano odmiany mieszańcowe i populacyjne i czy takie cechy jak wysokość roślin (Rokas jest odmianą półkarłową) i mieszańcowość mogą mieć znaczenie w interpretacji wyników.
4. Jak, na podstawie danych literaturowych i wyników własnych, można opisać zależność między stężeniem brasinosteroidów, aktywnością kompleksu receptorowego BR11 i aktywnością fotosyntetyczną, w tym intensyfikacją reakcji świetlnych, w procesie rozhartowania? Na ile na podstawie tych zależności można formułować opinie o mrozoodporności roślin rzepaku po rozhartowaniu?
5. Jakie zmiany biochemiczne zaindukowane w czasie hartowania są, zdaniem Doktorantki, kluczowe dla utrzymania mrozoodporności po okresie rozhartowania?

Ocena końcowa

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że mgr Julia Stachurska zrealizowała założone cele badawcze. Uzyskane wyniki są oryginalne i w istotny sposób wzbogacają istniejącą wiedzę na temat fizjologiczno-biochemicznych mechanizmów regulujących proces rozhartowania rzepaku. Doceniam wagę podjętego przez Doktorantkę tematu zarówno ze względu na walory poznawcze, jak i z uwagi na potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników, które mogą być wykorzystane w rolnictwie dla przeciwdziałania negatywnym skutkom

rozhartowania. Oceniana rozprawa pozwala stwierdzić, że mgr Julia Stachurska posiada zaawansowaną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Julii Stachurskiej pt. „Proces rozhartowania rzepaku – podłoże fizjologiczno-biochemiczne i konsekwencje dla mrozoodporności roślin” spełnia warunki określone w artykule 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 poz. 1789).

Zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Julii Stachurskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.



Elżbieta Kuźniak-Gębarowska