

Recenzja pracy doktorskiej mgr Julii Stachurskiej pt.:

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

Ocena formalna

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Julii Stachurskiej została wykonana w Zakładzie Biologii Rozwoju Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Anny Janeczko (promotor), oraz dr Magdaleny Ryś (promotor pomocniczy). Badania przedstawione w rozprawie sfinansowano w ramach projektu Opus pt.: ”Fizjologiczne podłoże zaburzeń mrozoodporności rzepaku ozimego w wyniku procesów deaklimacyjnych – rola brasinosteroidów” (UMO-2019/35/B/NZ9/02868) finansowanego przez Narodowego Centrum Nauki.

Uzasadnienie wyboru tematyki badawczej

Niniejsza praca doktorska dotyczy kompleksowej analizy procesu rozhartowania u rzepaku (*Brassica napus*). Badano wpływ rozhartowania na wydajność procesu fotosyntezy, strukturę błon biologicznych, akumulację białek szoku cieplnego (ang. Heat Shock Proteins - HSP) oraz gospodarkę hormonalną, ze szczególnym uwzględnieniem brasinosteroidów i ich potencjalnej roli jako substancji mogących zwiększać tolerancję roślin na niskie temperatury. Drugą część badań poświęcono opracowaniu nieinwazyjnych metod wczesnego wykrywania spadku mrozoodporności, które mogłyby być wykorzystywane w warunkach polowych.

Zespół kierowany przez prof. Annę Janeczko od wielu lat prowadzi badania nad identyfikacją oraz określeniem funkcji hormonów steroidowych u roślin, między innymi na jęczmieniu, pszenicy zwyczajnej oraz rzepaku. Wykazano, że brasinosteroidy biorą udział w regulacji

wzrostu i rozwoju roślin, ale również w odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne, w tym na niską temperaturę, między innymi pełniąc funkcję regulatorową w szlakach transdukcji sygnału.

Zjawisko rozhartowania czyli spadku mrozoodporności spowodowane gwałtownym wzrostem temperatur w okresie zimowym bądź wczesną wiosną jest coraz częściej obserwowane, ze względu na postępujące ocieplenie klimatu. Jest ono wysoce niekorzystne dla roślin, gdyż stają się one bardziej podatne na uszkodzenia podczas kolejnych spadków temperatury poniżej zera. Wiąże się to z obniżeniem plonowania i ze stratami ekonomicznymi. Dodatkowo, wzrosty temperatur mogą zaburzać wernalizację odmian ozimych gatunków uprawnych, który jest niezbędna do zaindukowania ich rozwoju generatywnego. W przeciwieństwie do hartowania roślin w chłdzie, proces rozhartowania nie został jak dotąd szczegółowo poznany, stąd obserwowane w ostatnich latach zainteresowanie tą tematyką badawczą.

Mgr Julia Stachurska badała proces rozhartowania u odmian ozimych rzepaku (*Brassica napus*), które dominują w uprawach na terenie Polski ze względu na ich wyższe plonowanie w porównaniu z odmianami jarymi. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego areał upraw rzepaku w Polsce w 2024 roku wynosił około 1,0 mln ha, a uzyskane plony sięgały 3,4 milionów ton. Zapewnia to Polsce trzecie miejsce wśród największych producentów rzepaku wśród krajów europejskich. Z rzepaku pozyskiwany jest wysokiej jakości olej, bogaty w nienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 i omega-6 oraz antyoksydanty. Jest on również doskonałym źródłem białka.

Struktura pracy

Pracę doktorską mgr Julii Stachurskiej stanowi cykl sześciu spójnych tematycznie publikacji naukowych opublikowanych w latach 2020-2024. Cztery z nich to artykuły oryginalne, napisane w języku angielskim. Dwie pozostałe to prace przeglądowe zawierające charakterystykę fizjologicznych i biochemicznych procesów zachodzących podczas hartowania roślin w chłdzie oraz zjawiska rozhartowania, jedna opublikowana w języku polskim w czasopiśmie Kosmos a druga w angielskim w czasopiśmie Agronomy. Należy podkreślić, iż wszystkie prace anglojęzyczne zostały opublikowane w czasopiśmie znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). Artykuły przeglądowe stanowią bardzo dobre wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą przez Doktorantkę. Jednakże w mojej ocenie, włączenie do cyklu publikacji artykułu anglojęzycznego, który jest obszerniejszy i zawiera bardziej kompleksowe omówienie tematu zamiast obu z nich, byłoby wystarczające.

Opracowanie (autoreferat) zawiera następujące rozdziały: (1) wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład cyklu publikacji, (2) wprowadzenie, (3) cele pracy, (4) materiał roślinny oraz schematy eksperymentów, (5) metody badawcze, (6) podsumowanie najważniejszych wyników, (7) wnioski, (8) spis literatury, (9) streszczenie rozprawy doktorskiej w języku polskim oraz angielskim oraz (10) załączniki. Jako załączniki Doktorantka umieściła oświadczenie promotora, oświadczenie autora pracy, wydruki publikacji, oraz oświadczenia współautorów poszczególnych publikacji oraz oświadczenie Doktoranta dotyczące ich indywidualnego udziału w badaniach.

Łączna wartość współczynnika oddziaływania (ang. impact factor – IF), zgodnie z rokiem 2023 wynosi 22,5 a liczba punktów MNiSW – 570 i świadczy o wysokim poziomie naukowym prezentowanych badań. Należy podkreślić, że w pięciu publikacjach mgr Julia Stachurska jest pierwszym autorem, a dodatkowo w publikacji nr 2 i 4 autorem korespondencyjnym, co wyróżnia ją na tym tle, gdyż zwyczajowo to promotor pełni tę rolę.

Na podstawie analizy oświadczeń Doktorantki oraz współautorów stwierdzam, iż jej indywidualny wkład w powstanie wyżej wymienionych prac był znaczący i tym samym został spełniony wymóg formalny stawiany rozprawom doktorskim. Doktorantka brała udział w większości prac eksperymentalnych, które obejmowały: przeprowadzeniu doświadczeń, zbiorze prób do analiz, wykonaniu pomiarów parametrów fizjologicznych oraz analiz molekularnych. Ponadto, wykonała analizy statystyczne oraz uczestniczyła w przygotowaniu wszystkich manuskryptów oraz ich poprawie zgodnie z uwagami recenzentów.

Autoreferat został przygotowany starannie. Przebieg eksperymentów oraz duża część wyników została przedstawiona w formie graficznej, a wykaz zastosowanych metod badawczych Doktorantka umieściła w tabeli, co było dużym ułatwieniem dla czytającego. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na brak wykazu stosowanych skrótów, który w moim odczuciu byłby bardzo przydatny oraz nieliczne błędy dotyczące stosowanej nomenklatury.

Podsumowując stwierdzam, iż pomimo nielicznych uchybień dysertacja została przygotowana poprawnie, w sposób zgodny z wymogami formalnymi stawianymi pracom doktorskim.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

W przedłożonym opracowaniu mgr Julia Stachurska zawarła cztery główne cele pracy, które zostały sformułowane poprawnie, brak natomiast hipotez badawczych. Zastosowała szereg metod badawczych, które zostały dobrane właściwie. Mam natomiast zastrzeżenia odnośnie wniosków, ponieważ w mojej ocenie konkluzje zamieszczone w rozdziale nr 6 nie dotyczą przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Proszę zatem o sformułowanie wniosków końcowych, z uwzględnieniem procesu rozhartowania.

Punktem wyjścia w badaniach nad procesem rozhartowania było scharakteryzowanie poziomu mrozoodporności u dziesięciu odmian rzepaku: 9 ozimych i jednej jarej. Doktorantka wykazała, że, odmiany różniły się tzw. mrozoodpornością bazową, która zgodnie z przewidywaniami była wyższa u odmian ozimych w porównaniu z odmianą jarą, oraz że wszystkie posiadały zdolność hartowania w chłodzie. Rozhartowanie roślin spowodowało obniżenie mrozoodporności u wszystkich odmian, jednakże jej poziom pozostał wyższy w porównaniu z roślinami niehartowanymi. Można zatem stwierdzić, że w zależności od odmiany proces rozhartowania przebiegał wolniej bądź szybciej i nie był on bezpośrednio skorelowany z mrozoodpornością bazową. Utrzymywanie się podwyższonego poziomu mrozoodporności po rozhartowaniu w porównaniu do roślin niehartowanych Doktorantka nazywa tolerancją na rozhartowanie. Zjawisko to obserwowane jest również u innych gatunków, np. traw pastewnych. W tym miejscu, mam pytanie czy Doktorantka mierzyła mrozoodporność odmian rzepaku po ich umieszczeniu w warunkach rozhartowujących na okres czasu dłuższy niż siedem dni i jak wtedy kształtowała się mrozoodporność roślin. Ponadto, czy Doktorantka badała wpływ długości dnia na proces rozhartowania. Ciekawym zagadnieniem w kontekście odporności roślin na mróz jest proces ponownego hartowania roślin w chłodzie (rehartowania) i związanego z tym zjawiska pamięci stresowej.

Następnie Doktorantka wykonała szereg analiz, które miały na celu identyfikację zmian indukowanych w roślinach podczas rozhartowania u czterech odmian rzepaku: odmiany jarej oraz trzech odmian ozimych oraz dwóch o wyższym poziomie mrozoodporności oraz jedna o poziomie odporności zbliżonym do odmiany jarej.

W dużym stopniu, proces rozhartowania prowadził do przywrócenia stanu fizjologiczno-biochemicznego, jaki obserwowany był u roślin niehartowanych, tj. akumulacji hormonów związanych ze wzrostem i rozwojem, obniżenie poziomu tzw. hormonów stresowych oraz

poziomu białek szoku cieplnego (ang. heat shock proteins – HSP), czy obniżenie płynności błon komórkowych.

Oryginalnym aspektem poruszonym w pracy przez mgr Julię Stachurską jest udział hormonów brasinosteroidowych w odpowiedzi rzepaku na niską temperaturę. U badanych odmian Doktorantka zidentyfikowała 6 związków, które sklasyfikowała jako brasinosteroidy. Na podstawie profilowania ich akumulacji Doktorantka wykazała, że poziom brasinosteroidów był skorelowany z wyższym poziomem mrozoodporności, zarówno podczas hartowania, jak i w warunkach rozhartowujących. Jednocześnie, podczas hartowania Doktorantka obserwowała obniżony poziom transkryptu oraz białka genu *BRI1* kodującego błonowy receptor dla brasinosteroidów u wszystkich badanych odmian. Natomiast w warunkach rozhartowujących obserwowano wzrost akumulacji transkryptu u odmiany jarej oraz stosunkowo mało odpornej odmiany ozimej, podczas gdy u odmian bardziej mrozoodpornych pozostawał on na obniżonym poziomie. Obniżony poziom transkryptu *BRI1* w niskiej temperaturze był skorelowany z wydajnością fotosystemu PSII, co mogło być związane z zahamowaniem wzrostu. Podczas rozhartowania obniżeniu uległa również akumulacja transkryptu *SERK1*, również podlegający ekspresji zależnej od brasinosteroidów. Dalsze badania, pozwoliły na wykazanie ochronnej roli 24-epibrasinolidu przeciw uszkodzeniom mrozowym u niektórych z badanych odmian, która jednakże, była zależna od oraz intensywności stresu. Do tej części wyników mam kilka pytań:

1. Jaka jest funkcja receptora *BRI1* u rzepaku.
2. Proszę o krótkie przedstawienie szlaków regulatorowych zależnych od brasinosteroidów.
3. Czy brasinosteroidy biorą udział w procesie wernalizacji odmian ozimych.
4. Proszę o krótkie przedstawienie mechanizmu działania preparatu Asahi SL.
5. Proszę o wskazanie najistotniejszych procesów związanych z tolerancją na rozhartowanie u rzepaku.

Dalsza część pracy dotyczyła zastosowania nieinwazyjnych metod pomiarowych do wykrywania stanu rozhartowania roślin. Za nieznaną dotąd metody Doktoranta wskazuje pomiar opóźnionej fluorescencji chlorofilu (DF), pomiar odbiciowości modulowanej (MR820) oraz pomiar własności spektralnych liści. Zastosowanie ich na prowadzić na dużych obszarach rolnych pozwoliłoby na zastosowanie środków zaradczych w momencie wystąpienia przymrozków i minimalizowanie strat.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej stanowiące zarazem oryginalne rozwiązanie problemu uważam: (1) identyfikację receptora BRI1, (2) wykazanie udziału hormonów brasinosteroidowych w procesie hartowania i rozhartowania (3) identyfikację kwasu indolilo-3-karboksylowego (I3CA), (5) opracowanie nowych nieinwazyjnych metod do monitorowania stanu rozhartowania roślin.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską mgr Julii Stachurskiej oceniam pozytywnie. Na podkreślenie zasługuje wieloaspektowa analiza zjawiska rozhartowania u rzepaku ozimego przeprowadzona przez Doktorantkę, właściwy wybór materiału badawczego, wskazanie udziału brasinosteroidów w tym procesie oraz potencjalne zastosowanie aplikacyjne uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że pod względem formalnym i merytorycznym oceniana dysertacja mgr Julii Stachurskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone na podstawie art. 187 ust. 1-2 i art. 190 ust. 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r., poz. 478. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Julii Stachurskiej z zakresu nauk biologicznych oraz Jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Julii Stachurskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

dr hab. Izabela Pawłowicz