

Prof. dr hab. Hanna Bandurska
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Fizjologii Roślin
ul. Wołyńska 35
60-637 Poznań

Poznań, 28 listopad 2024

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kaczanowskiej

pt. „Mechanizmy tolerancji sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na stres chłodu”
wykonanej w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii
Nauk w Krakowie, pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. inż. Franciszka Janowiaka

1. Podstawa opracowania recenzji

Podstawą formalną recenzji jest decyzja Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z dnia 20 marca 2018 roku o powołaniu mnie na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej. Celem recenzji jest stwierdzenie czy przedłożona rozprawa doktorska spełnia wymogi określone artykułem 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789).

2. Informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Badania w przedstawionej do oceny rozprawie realizowane były w ramach projektu: ERANET GAS - Genetyczna Adaptacja Sorga: oparta na genomice hodowla rośliny energetycznej nowej generacji dla zrównoważonego rozwoju Europy / ERANET GAS – Genetic Adaptation of Sorghum: Genomics-based breeding of a sustainable, next-generation bioenergy crop for Europe, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBR), Nr. umowy ERA-NET-BIOENERGY/3/2013.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie zwartej opracowania liczącego 120 stron, które posiada typowy układ przyjęty dla tej formy prac. Pierwszy rozdział to „Wstęp”, który zajmuje 13 stron. W rozdziale tym Doktorantka omówiła, w oparciu o dane literaturowe, mechanizmy oddziaływania abiotycznych czynników stresowych na rośliny ze szczególnym uwzględnieniem stresu chłodu. W pierwszej części rozdziału opisała w sposób ogólny efekty oddziaływania tego stresu na rośliny. W kolejnych częściach omówiła wpływ chłodu na sprawność aparatu fotosyntetycznego i funkcjonowanie aparatów szparkowych. Dalszą część tego rozdziału Doktorantka poświęciła roli ABA w reagowaniu roślin na czynniki

stresowe. Tutaj miałabym komentarz. Doktorantka podaje, że „głównym miejscem syntezy ABA jest korzeń skąd jako substancja sygnałowa hormon ten jest transportowany w ksylemie do innych części rośliny.” Jako źródło podaje pracę Zhang et al. z 1987 roku. Obecnie są nowsze dane literaturowe dotyczące tego zagadnienia. W badaniach na *A. thaliana*, wykazano, że takim sygnałem jest peptyd CLE-25, który transportowany z korzenia do liści w nich indukuje syntezę ABA (Gupta A., Rico-Medina A., Caño-Delgado A. I. The physiology of plant responses to drought. *Science* **2020**, *368*, 266–269, doi:10.1126/science.aaz7614). Inni autorzy wykazali, że źródłem ABA w korzeniu jest jego transport z liści (McAdam, S.A.N.; Brodribb T.J.; Ross J.J. Shoot derived abscisic acid promotes root growth. *Plant Cell Environ.* **2016**, *39*, 652–659). Ciekawe byłoby skonfrontowanie tych doniesień z wynikami uzyskanymi przez Doktorantkę. Mam też pytanie, Doktorantka podaje, że ABA uczestniczy w „regulacji syntezy niektórych składników ściany komórkowej”. Jakie to są składniki oraz jakie mają znaczenie w odpowiedzi rośliny na stres?

W kolejnych częściach wstępu omawiany jest wpływ chłodu na stosunki wodne w liściach i korzeniach oraz generowanie stresu oksydacyjnego. W moim odczuciu część dotycząca wpływu chłodu na stosunki wodne jest omówiona mało klarownie. Stres chłodu prowadzi do zakłócenia stosunków wodnych w roślinie co skutkuje wystąpieniem deficytu wody, który jest wtórnym stresem. Doktorantka podaje, że w warunkach stresowych dochodzi do zmian parametrów gospodarki wodnej. Nie wyjaśnia w sposób klarowny jakie to są parametry, jak zmieniają się i jakie są skutki tych zmian. Dlatego prosiłabym o wyjaśnienia w tym zakresie. Nie mogę też zgodzić się ze stwierdzeniem, że wartość potencjału wody tkanek jest wypadkową strat wody i dostępności wody w glebie bowiem istotną rolę może tu również odgrywać akumulacja substancji osmotycznych. W części dotyczącej stresu oksydacyjnego Doktorantka podaje, że antyoksydanty wpływają na wzrost roślin poprzez modyfikację wzrostu wydłużeniowego. Prosiłabym o wyjaśnienie na czym polega ten wpływ. Ostatnia część tego rozdziału poświęcona jest sorgo. Krótko scharakteryzowana została systematyka tego gatunku, jego pochodzenie, wymagania oraz znaczenie jako rośliny uprawnej. Uzasadniony został wybór tego gatunku jako przedmiotu badań. Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) jako gatunek odporny na suszę glebową, wydaje się być dobrym kandydatem na roślinę uprawną dla przyszłego rolnictwa w Europie w dobie zmian klimatycznych powodujących ocieplenie klimatu. Głównym czynnikiem ograniczającym wprowadzenie sorga w Europie jest mała tolerancja tej rośliny na niskie temperatury, które mogą pojawiać się w tym rejonie wczesną wiosną. Informacje zawarte w tym rozdziale stanowią wprowadzenie w tematykę badawczą

przedstawionej do recenzji rozprawy i wskazują na jej ważność. W moim odczuciu zabrakło jednak uwzględnienia nowszych pozycji literaturowych.

Dalsza część opracowania obejmuje omówienie celu naukowego rozprawy oraz ważniejszych wyników i jest podzielona na następujące rozdziały: „Cel”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Literatura” oraz „Źródła internetowe”. Głównym celem badań była fizjologiczna i fenotypowa charakterystyka reakcji linii rodzicielskich sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) i ich populacji mapujących na temperaturę chłodową (13/10°C dzień/noc). Jak podaje Doktorantka, do badań wybrano linie rodzicielskie i populacje mapujące wykorzystywane obecnie w tradycyjnej hodowli, molekularnej genetyce i genomice sorga. W tym celu na podstawie pomiaru istotnych dla wzrostu roślin parametrów fizjologicznych (wydajność kwantowej fotosystemu II (PSII), stan aparatów szparkowych, potencjał osmotyczny, poziom ABA, całkowita aktywność antyoksydacyjna, zazielenienie liści, poziom uszkodzenia błon komórkowych, pH soku ksylemu) zbadano zróżnicowanie w reagowaniu i tolerancji badanych linii na stres chłodu.

W rozdziale „Materiał i metody” (obejmującym 20 stron) opisany został materiał badawczy, którym były siewki sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Sześć linii rodzicielskich o różnej tolerancji na chłód (tolerancyjne M71 i Ji2731, wrażliwe SS79, Keller, Btx623 oraz linia pośrednia Etian) oraz cztery populacje mapujące (JxE: 176 linii, SxM: 41 linii, SxE: 50 skrajnie różniących się linii - 26 tolerancyjne, 24 wrażliwe, SxJ: 49 skrajnie różniących się linii - 25 tolerancyjne, 24 wrażliwe). Nasiona do badań zostały przesłane przez Prof. Roda Snowdona (Uniwersytet w Giessen, Niemcy) koordynatora projektu, w ramach którego praca została zrealizowana. W dalszej części rozdziału Doktorantka opisała warunki kiełkowania i wzrostu roślin. Wymienione zostały przeprowadzone eksperymenty (tabela 1) oraz opisane i zobrazowane w postaci schematów. Brakuje jednak informacji odnośnie pojemności wazonów użytych w poszczególnych doświadczeniach. Przedstawiono także dosyć szczegółowy opis stosowanych metod. W rozdziale tym zamieszczono zdjęcia badanych roślin oraz niektórych przyrządów wykorzystanych do pomiarów analizowanych parametrów. Analizę statystyczną uzyskanych wyników w poszczególnych doświadczeniach przeprowadzono za pomocą pakietu STATISTICA 12 (StatSoft, USA)

Rozdział „Wyniki” zawarty na 49 stronach jest najobszerniejszym rozdziałem dysertacji. Uzyskane wyniki zaprezentowano w formie dobrze przygotowanych 50 wykresów. Wkradło się tu jednak trochę błędów. W podpisie pod ryciną 13 powinno być - sześciu linii rodzicielskich zamiast - dwóch linii rodzicielskich. Na wykresach 20-25 oraz w ich podpisach

należałoby uwzględnić kolejność oddziaływania zastosowanych czynników stresowych czyli susza-chłód zamiast chłód-susza. Na wykresach 26-32 nie zaznaczono, która linia pozioma obrazuje linię Ji723, a która linię Etain. W kolejnym rozdziale Doktorantka na 12 stronach przeprowadziła dyskusję poszczególnych wyników z uwzględnieniem doniesień literaturowych w zakresie badań nad reagowaniem roślin na stres chłodu.

Rozdział „Wnioski” jest w mojej opinii raczej podsumowaniem uzyskanych wyników. Ten ważny rozdział zawiera aż 10 raczej szczegółowych stwierdzeń, które można by pogrupować i ująć w postaci bardziej uogólnionych wniosków adekwatnych do celu i tematu rozprawy. Moim zdaniem wniosek 10 powinien znajdować się na początku. Natomiast wniosek 1 powinien być połączony z wnioskiem 3 a wniosek 2 z 4 i 8. Rozdział „Literatura” obejmuje 141 pozycji literaturowymi, w których znalazłam jedynie 10 prac z ostatnich 4 lat.

Całość pracy jest przygotowana starannie, jej układ jest klarowny a praca napisana jest językiem poprawnym. Autorka nie ustrzegła się jedynie drobnych błędów stylistycznych jednak nie mają one wpływu na ogólną ocenę pracy i nie umniejszają w żaden sposób jej wartości naukowej. Z formalnego punktu widzenia rozprawa pt „Mechanizmy tolerancji sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na stres chłodu” nie budzi żadnych zastrzeżeń. 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. z 2017 r. poz. 1789).

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Tematyka rozprawy dotyczy ważnego problemu związanego z mechanizmami reagowania sorga na stres chłodu. Temperatura chłodowa, definiowana jako temperatura w zakresie od 0°C do 15°C jest istotnym czynnikiem ograniczającym wzrost oraz plonowanie roślin tropikalnych i subtropikalnych, do których należy sorgo, a uprawianych w regionach o umiarkowanym klimacie, w tym w Polsce. Występujące w tych rejonach częste i nagłe spadki temperatury w maju i czerwcu mogą powodować poważne uszkodzenia siewek, a nawet śmierć, co prowadzi do istotnego obniżenia plonu. Zbyt niska temperatura opóźnia i hamuje kiełkowanie, wschody, wzrost i rozwój roślin a w konsekwencji obniża akumulację biomasy i plon. Dlatego, podjętą w rozprawie tematykę uważam za ważną i aktualną.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań recenzowanej pracy doktorskiej stanowią cenne źródło informacji w zakresie mechanizmów reagowania na stres chłodu odpowiedzialnych za zróżnicowaną tolerancję w obrębie linii sorga. Za najważniejsze

osiągnięcia uważam wykazanie, że chłód powodował szybkie zaburzenia w funkcjonowaniu aparatu fotosyntetycznego ocenianego na podstawie pomiaru fluorescencji chlorofilu *a*. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują iż reakcja aparatu fotosyntetycznego badanych linii sorga na ten czynnik stresowy jest bardzo zróżnicowana i co ważne szybka. Dlatego, ocena stanu funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego za pomocą tej nieinwazyjnej metody może być przydatnym kryterium selekcji tolerancyjnych odmian sorga. Ze wszystkich mierzonych parametrów fluorescencji chlorofilu najbardziej różnicującym badane linie sorga była wydajność kwantowa PSII (YIELD). Znaczne obniżenie efektywnej wydajności kwantowej PSII u wszystkich badanych linii sorga odnotowano już w pierwszym dniu traktowania chłodem. W tym początkowym okresie chłodzenia nie zaobserwowano jednak zamykania aparatów szparkowych co wskazuje na inne niż dostępność CO₂ przyczyny obniżenia wydajności PSII. Dopiero w późniejszym okresie działania chłodu oraz po jego zakończeniu obniżenie wydajności PSII było skorelowane z zamykaniem aparatów szparkowych, a więc z dostępnością CO₂. Największe różnice pomiędzy liniami występowały w późniejszych etapach chłodzenia oraz w czasie zdrowienia (*recovery*). Linie rodzicielskie bardziej tolerancyjne na chłód charakteryzowały się też wyższą wydajnością kwantową w porównaniu do linii wrażliwych, a w trakcie *recovery* w pełni odzyskiwały normalny stan tego parametru. Czynnikiem różnicującym badane linie był też wiek liści. U linii wrażliwych największe obniżenie wydajności fotosyntezy stwierdzono w liściach najstarszych fizjologicznie podczas gdy u linii względnie chłodo-tolerancyjnych różnice we wrażliwości liści były niewielkie.

Innym parametrem różnicującym badane linie w późniejszym okresie działania chłodu był stan aparatów szparkowych. U wszystkich linii rodzicielskich, aparaty szparkowe były przymykane w tym okresie. Natomiast między podatnymi i tolerancyjnymi mieszańcami populacji mapujących SxM i SxJ większe zróżnicowanie przewodności szparkowej stwierdzono podczas *recovery* niż w trakcie działania stresu chłodu. Szybsze otwieranie aparatów szparkowych oraz wcześniejsze przywrócenie wydajności fotosyntezy stwierdzono w tym okresie u mieszańców tolerancyjnych w porównaniu z podatnymi.

Uzyskane w prezentowanej pracy wyniki potwierdziły, że czynnikiem regulującym stan aparatów szparkowych jest ABA. Wykazano bowiem, że wzrost poziomu ABA w liściach przyczyniał się do obniżenia przewodności szparkowej. Wyniki wskazują również, że tolerancyjna linia rodzicielska M71 charakteryzowała się większą akumulacją tego hormonu niż wrażliwa linia SS79. Ponadto, zależności pomiędzy zmianami w poziomie ABA w czasie chłodu w różnych częściach roślin mogą wskazywać na jego transport z korzeni do liści.

Parametrem różnicującym badane linie sorgo jest również poziom uszkodzenia błon komórkowych, na co wskazuje jego znaczne zróżnicowanie wśród badanych linii populacji mapujących i mniejsze uszkodzenia u linii tolerancyjnych. Z badań ponadto wynika, że parametrem przydatnym w selekcji odmian tolerancyjnych na chłód może być potencjał osmotyczny w liściach. Większe obniżenie tego parametru stwierdzono w liściach tolerancyjnej linii M71 niż wrażliwej SS79. Prawdopodobnie było to efektem akumulacji substancji osmotycznych. Proszę o odpowiedź na pytanie jakie to mogły być substancje i czy ich akumulacja mogła być efektem zwiększonego poziomu ABA i dlaczego?

Podsumowując merytoryczną ocenę pracy stwierdzam, że przedstawione przez Panią mgr Katarzynę Kaczanowską badania, które zostały wykonane w oparciu o nowe techniki oraz bardzo duży materiał doświadczalny dały bogaty obraz zróżnicowanej reakcji bogatej gamy linii sorga na chłód będący ważnym czynnikiem w uprawie tej rośliny. Wnoszą nowe i cenne informacje na temat różnic w odpowiedzi i tolerancji tych linii sorga na chłód. Pomimo szerokiego zakresu wykonanych analiz wyniki nie dają pełnego obrazu mechanizmów odpowiedzialnych za zróżnicowaną tolerancję linii sorga na stres chłodu. Wskazują jednak na dużą złożoność zależności istniejących pomiędzy zmianami analizowanych parametrów a tolerancją badanych na badanych linii na chłód. Wszystkie uwagi i komentarze zamieszczone w recenzji nie umniejszają wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską, zważywszy na duży stopień trudności analizowanych zagadnień, znaczący zakres badań, uzyskane oryginalne wyniki i aktualną tematykę oceniam pozytywnie. Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa jest dobrym opracowaniem naukowym. Stwierdzam, że treść i forma przedstawionej rozprawy pt. „Mechanizmy tolerancji sorga (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) na stres chłodu” spełnia wszystkie wymagania Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytułach Naukowych. (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789). Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie o dopuszczenie jej Autorki – mgr Katarzyny Kaczanowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

