

Poznań, 22 sierpnia 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Sybilskiej

**„Molekularne mechanizmy sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA) podczas kiełkowania
ziarniaków jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) ze szczególnym uwzględnieniem roli
jądrowego kompleksu wiążącego czapeczkę mRNA (CBC) ”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem dr hab. Agaty Daszkowskiej-Golec prof. UŚ w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Rozprawa ma formę zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych (art. 187 ust. 3, Dz.U.2024.1571 t.j.), zawiera dwa streszczenia; wykaz skrótów; autoreferat z stosownym wprowadzeniem; cel i założenia rozprawy; materiał badawczy, warunki eksperymentalne i metody; omówienie i dyskusję najważniejszych wyników; wnioski i spis literatury. Do rozprawy załączono trzy spójne tematycznie prace wieloautorskie opublikowane recenzowanych czasopismach: *Frontiers in Plant Science*, *Scientific Reports* oraz *BMC Plant Biology*.

1. *Frontiers in Plant Science* (2023) **14**:1144990. Sybilska E and Daszkowska-Golec. Alternative splicing in ABA signaling during seed germination.
2. *Scientific Reports* (2024) **14**, 18278. Sybilska, E., Collin, A., Sadat Haddadi, B. *et al.* The cap-binding complex modulates ABA-responsive transcript splicing during germination in barley (*Hordeum vulgare*).
3. *BMC Plant Biology* (2025) **25**, 619. Sybilska, E., Haddadi, B.S., Mur, L.A.J. *et al.* Mapping the molecular signature of ABA-regulated gene expression in germinating barley embryos.

Dwuautorska publikacja Kandydatki w *Frontiers in Plant Science* ma charakter pracy przeglądowej. Pozostałe dwie publikacje naukowe to prace eksperymentalne, wieloautorskie. Z treści załączonych oświadczeń wynika, że udział Kandydatki w powstawaniu prac był znaczący, a w przypadku prac

eksperymentalnych – wiodący. Na tej podstawie stwierdzam, że jej wkład jest wystarczający do dokonania oceny zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa, a rozprawa spełnia wymogi formalne. Oceny dokonuję na podstawie art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 18 lipca 2018 r. z późn. zmianami, uwzględniając prezentację wiedzy teoretycznej Kandydatki, jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz oryginalność rozwiązania problemu naukowego.

Ocena prezentacji wiedzy teoretycznej

Rozprawa doktorska porusza istotne zagadnienia jakim jest poznanie molekularnych mechanizmów zależnych od ABA, podczas kiełkowania ziarniaków jęczmienia zwyczajnego z perspektywy funkcjonowania kompleksu wiążącego czapeczkę (CBC). Autorka rzetelnie i dogłębnie wprowadza w tematykę rozprawy opisując rolę ABA podczas kiełkowania nasion oraz rolę kompleksu CBC jako regulatora odpowiedzi na ABA podczas kiełkowania i w regulacji alternatywnego splicingu. Wprowadzenie rozszerzone jest o treści zawarte w pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy. Problematyka, obejmująca rolę ABA i kompleksu CBC w procesie kiełkowania nasion, przedstawiona jest w sposób spójny, logiczny i zrozumiały. Co istotne, Kandydatka potrafi wskazać luki w istniejącej wiedzy, co pozwala jej sformułować problem badawczy i odpowiednie hipotezy. *Cel pracy* ma charakter poznawczy. Część ta jest klarowna, choć miejscami zawiera niewielkie niedociągnięcia językowe. *Materiał badawczy, warunki eksperymentalne i metody* są opisane w sposób rzetelny i konsekwentny, umożliwiają powtórzenie eksperymentów. Informacje te zawarte są zarówno w autoreferacie, jak i w odpowiednich rozdziałach prac włączonych w rozprawę. Rozprawa doktorska zawiera więc stosowny opis materiału badawczego, jego źródło oraz warunki traktowania.

Rozdział „*Omówienie i dyskusja najważniejszych wyników*” odnosi się do merytorycznej zawartości prac eksperymentalnych wchodzących w skład rozprawy. Tytuł tego rozdziału jest dość niefortunny – rolą recenzenta jest ocena zawartości w odniesieniu do wymagań ustawowych. Zatem ocenie podlegają wszystkie przedłożone dokonania Kandydatki, w odniesieniu do oświadczeń współautorów. Ta część pracy jest dobrze ustrukturyzowana: odniesiona do konkretnych publikacji i skonfrontowana z hipotezami badawczymi zawartymi w celu pracy. Sformułowane *Wnioski* są zwięzłe, konkretne i co ważniejsze, jasno oddzielone od dyskusji – w mojej opinii mogłyby być powiązane z hipotezami. *Literatura* zarówno w opracowaniu Kandydatki jak i w załączonych artykułach jest poprawnie

cytowana, zgodnie z zasadami stosowanymi w piśmiennictwie naukowym. *Kopie artykułów* stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora, zostały dołączone do treści rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, rozprawa doktorska Kandydatki spełnia w mojej opinii wymagania ustawowe odnoszące się do prezentacji ogólnej wiedzy teoretycznej osoby ubiegającej się o stopień doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ocena umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

W ramach realizacji rozprawy doktorskiej Kandydatka podjęła się wymagającej tematyki badawczej obejmujące prace z rośliną uprawną jaką jest jęczmień zwyczajny – gatunek o istotnym znaczeniu agronomicznym. Tego rodzaju materiał badawczy stawia szczególne wyzwania organizacyjne i metodologiczne, a jego wykorzystanie wiązało się z koniecznością dużego nakładu pracy oraz konsekwentnego zaangażowania ze strony Autorki. Pragnę podkreślić, że warsztat badawczy Kandydatki do stopnia doktora jest imponujący. Zadania badawcze zostały zrealizowane z wykorzystaniem uznanych i nowoczesnych metod, obejmujących procedury selekcji mutantów TILLING i ich fenotypowania, analizy transkryptomiczne – zarówno klasyczne, jak i przestrzenne – oraz analizy metabolomiczne. Zastosowano podejścia bioinformatyczne, w tym integrację danych transkryptomicznych i metabolomicznych, co pozwoliło na uzyskanie wszechstronnego obrazu badanych procesów biologicznych. Opis metod i powiązanych z nimi eksperymentów wskazuje, że zostały skrupulatnie zaplanowane i zrealizowane. Wnioski z przeprowadzonych eksperymentów są uzasadnione naukowo i przekonujące. Co istotne, Kandydatka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, a jej twórczy wkład odegrał kluczową rolę w procesie ich powstawania. Dyskusja wyników jest zwięzła, ciekawa i oryginalna w podejściu do problemów naukowych. Ta część pracy wskazuje na dobrą znajomość tematyki badawczej przez Kandydatkę.

Podsumowując, rozprawa doktorska Kandydatki spełnia, a w wielu aspektach przewyższa wymagania ustawowe odnoszące się do prezentacji umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej osoby ubiegającej się o stopień doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. Autorka rozprawy wykazała się doskonałą znajomością metod badawczych i podejść eksperymentalnych. Praca świadczy o

dojrzałości naukowej Kandydatki, jej samodzielności badawczej oraz znaczącym potencjale do dalszego rozwoju w karierze naukowej.

Oryginalność rozwiązania problemu badawczego

W pracy Sybilska i in., 2024 Autorka testowała dwie hipotezy badawcze, które odnosiły się do funkcji kompleksu CBC. *Hipoteza 1*- kompleks CBC uczestniczy w regulacji alternatywnego splicingu w odpowiedzi na ABA, potencjalnie modulując ekspresję genów kontrolujących kiełkowanie ziarniaków oraz *Hipoteza 2* - Kompleks CBC reguluje wzajemne oddziaływania między ABA a innymi fitohormonami kontrolując zdolność do kiełkowania ziarniaków jęczmienia. Na podstawie otrzymanych wyników Autorka stwierdziła, że podwójny mutant *hvcbp20.ab/hvcbp80.b* jest niewrażliwy na ABA. Szukając przyczyny obserwowanego fenotypu przeprowadziła analizę transkryptomiczną, a wśród wyodrębnionych grup genów (klastrow) zidentyfikowała jeden zestaw (klastrow C8), który charakteryzował się odmiennym kierunkiem w profilu transkrypcji, z przeciwnym wzorem u mutantu podwójnego w odniesieniu do mutantów pojedynczych. Analiza umożliwiła zatem identyfikację genów powiązanych z niewrażliwością na ABA u mutantu podwójnego. Autorka potwierdziła *hipotezę 1* i wykazała, że ABA istotnie wpływa na transkrypcję u badanym układzie eksperymentalnym, co przejawia się zmianą liczby genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG), transkryptów o zróżnicowanej ekspresji (DET), genów alternatywnie składanych (DAS) oraz transkryptów różnicowo wykorzystywanych (DTU). Szczególnie wyraźny efekt zaobserwowano u podwójnego mutantu *hvcbp20.ab/hvcbp80.b*, u którego stwierdzono podwyższoną aktywność transkrypcyjną oraz częstsze zdarzenia alternatywnego splicingu. W analizie DEG w tym genotypie odnotowano istotne wzbogacenie genów związanych z obróbką RNA. Dodatkowo, analizy bioinformatyczne ujawniły potencjalne interakcje pomiędzy kompleksem CBC a czynnikami splicingowymi. Analiza alternatywnego splicingu u podwójnego mutantu wskazała na najwyższą liczbę DET oraz istotnie podwyższoną liczbę transkryptów typu PTC (premature termination codon) oraz transkryptów podlegających ścieżce NMD (nonsense-mediated decay). Autorka potwierdziła również *hipotezę 2*, opierając się na wykazanych różnicach w profilu transkrypcyjnym podwójnego mutantu, obejmujących geny związane z regulacją szlaku brasinosteroidów. Dodatkowym argumentem

jest obserwowana podwyższona zawartość prekursora brasinosteroidów (BR), co wskazuje na nasilone procesy biosyntezy BR, a w konsekwencji na aktywację szlaku sygnałowego tego hormonu.

W oparciu o wyniki zawarte w pracy Sybilska i in., (2025) Kandydatka testowała i w konkluzji przyjęła dwie kolejne hipotezy. *Hipoteza 3* zakładała, że ABA indukuje specyficzne zmiany zarówno ekspresji genów jak i w metabolizmie kiełkujących zarodków jęczmienia pełniąc rolę sygnału molekularnego, koordynującego reakcje adaptacyjne oraz interakcje fitohormonalne w odpowiedzi na stres środowiskowy. W celu jej weryfikacji traktowała ABA kiełkujące zarodki odmiany „Sebastian”. W wyniku analiz stwierdziła, że ABA działa jako represor transkrypcji genów w procesie kiełkowania oraz zidentyfikowała klasyczne czynniki transkrypcyjne zaangażowane w ten proces. Zastosowanie analizy Gene Ontology pozwoliło na wyodrębnienie nadreprezentowanych kategorii genów. Zaobserwowano, że ABA hamuje transkrypcję określonych grup genów związanych z procesami metabolicznymi i strukturalnymi, a także – zgodnie z oczekiwaniami – zidentyfikowano geny regulowane przez ABA, powiązane z reakcjami adaptacyjnymi na warunki stresowe. Uzyskane wyniki transkryptomyczne zostały ponadto skorelowane z profilem metabolicznym kiełkujących zarodków jęczmienia traktowanych ABA; wyodrębnione metabolity (32) powiązano z 35 DEGs.

Hipoteza 4 zakładała, że ABA wykazuje tkankową specyficzność działania w różnych obszarach kiełkujących zarodków jęczmienia. W wyniku przeprowadzonych analiz Autorka zidentyfikowała 49 transkryptów spośród 1586 DEG: 30 ulegało transkrypcji w koleoptylu (w tym 14 specyficznie), 20 w tarczce, 16 w korzeniu zarodkowym, 12 w mezokotylu (międzywęźlu zarodkowym), 9 DEG w liściu zarodkowym oraz 2 w liścieniach. Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę koleoptylu w odpowiedzi na działanie ABA podczas procesu kiełkowania, podkreślając jego znaczenie w tym procesie.

W konkluzji, do najważniejszych wyników rozprawy zaliczam:

1. wykazanie, że w przeciwieństwie do *Arabidopsis thaliana*, gdzie w regulację alternatywnego splicingu najprawdopodobniej zaangażowany jest głównie czynnik CBP80, u kiełkującego jęczmienia w proces ten zaangażowany jest cały kompleks CBC, co wskazuje na istnienie odmiennych mechanizmów regulacji alternatywnego splicingu u zbóż;
2. uzyskanie szczegółowego profilu transkrypcyjnego dla wyodrębnionych rejonów tkanek w obrębie kiełkującego zarodka jęczmienia, co stanowi istotny wkład w poznanie molekularnych podstaw wczesnych etapów rozwoju tej rośliny.

Do najważniejszych efektów pracy zaliczam:

1. opracowanie referencyjnego transkryptomu jęczmienia dla kiełkujących zarodków, co z pewnością przyczyni się do badań nad mechanizmami alternatywnego splicingu.

Podsumowując, rozprawa autorstwa mgr Ewy Sybilskiej zdecydowanie stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i cechuje się wysoką oryginalnością w podejściu do problemu badawczego. Kandydatka samodzielnie sformułowała hipotezy dotyczące roli ABA i kompleksu CBC w procesie kiełkowania nasion jęczmienia, które wypełniają istotną lukę w dotychczasowej literaturze. Zastosowane podejście metodologiczne, obejmujące integrację analiz transkryptomicznych, metabolomicznych oraz bioinformatycznych, pozwoliło na uzyskanie unikalnego i kompleksowego obrazu procesów biologicznych i zależności między fitohormonami podczas kiełkowania. Interpretacja wyników została przeprowadzona w sposób twórczy, prowadząc do sformułowania wniosków dotyczących roli ABA i kompleksu CBC w regulacji kiełkowania u jęczmienia. Praca wnosi istotny wkład do dziedziny nauk biologicznych i otwiera nowe kierunki do dalszych badań.

Uwagi

Kandydatka do stopnia doktora nie ustrzegła się pewnych niedociągnięć językowych, użycia żargonu czy drobnych nieścisłości, m.in. używanie pojęcia „ekspresja genu”, wyłącznie w odniesieniu do analiz transkryptomicznych. Mimo wszystko w pracy wystąpiła niewielka liczba potknięć językowych nieprecyzyjnych określeń i nie wpływają one na ogólną wartość rozprawy.

Podczas obrony proszę o ustosunkowanie się do następującej kwestii:

Na str. 36 Autorka stwierdza „*Zaobserwowane zmiany podkreślają kluczową rolę ABA jako molekularnego przełącznika, który w warunkach stresu abiotycznego inicjuje przeprogramowanie aktywności komórkowej z procesów wzrostowych na mechanizmy sprzyjające przetrwaniu*”. Nie mogę zgodzić się z tym stwierdzeniem, w mojej opinii jest to nadinterpretacja. ABA nie jest „przełącznikiem molekularnym”. W kontekście procesów sygnalizacyjnych - ABA jest ligandem - forma aktywna ABA wiąże się z receptorem i indukuje odpowiedź komórkową. Za przełączniki można uznać receptory ABA, które mają różną specyfikę i konformacje. Ponadto wszystkie doświadczenia zostały przeprowadzone w warunkach traktowania ABA, a nie w warunkach stresu abiotycznego.

Kiełkowanie jest procesem rozwojowym, nie stresowym, a Autorka nie wprowadziła do eksperymentów czynników stresowych. Należy też podkreślić, że ABA działa w sposób zależny od stężenia – niskie dawki mogą stymulować wzrost, natomiast wysokie go hamują. W pracy zastosowano stężenia wyższe od fizjologicznych, które mogą jedynie imitować warunki stresowe związane z podwyższonym poziomem ABA. Z tego względu obecność kategorii GO związanych ze stresem nie jest zaskakująca i wymaga ostrożniejszej interpretacji. Proszę Autorkę o odniesienie się do tej kwestii i doprecyzowanie użytych sformułowań.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Ewy Sybilskiej to wielowątkowe oryginalne i nowatorskie opracowanie o wysokim znaczeniu naukowym w dziedzinie. Zgłoszone powyżej uwagi i komentarze stanowią załączek do dalszej dyskusji. Wkład Kandydatki w rozwój badań nad molekularnymi mechanizmami zależnymi od ABA podczas kiełkowania nasion jęczmienia, z uwzględnieniem roli kompleksu CBC, oceniam bardzo wysoko. Praca spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 i na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

Z uwagi na wysoką wartość merytoryczną rozprawy, identyfikację odmiennych mechanizmów regulacji splicingu genów u zbóż; uzyskanie unikatowych profili transkrypcyjnych dla wyodrębnionych rejonów tkanek w obrębie kiełkującego zarodka jęczmienia, co znacząco poszerza wiedzę o molekularnych podstawach wczesnych etapów rozwoju tej rośliny; oraz nowatorskie powiązanie wyników transkryptomicznych i metabolicznych wnoszę o *wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą*.