

Kraków, 12 marca 2026

Prof. dr hab. Marcin Rapacz

Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Sivakumara Krishnamoorthyego

Podstawa prawna

Recenzja dotyczy rozprawy doktorskiej pt. „Determining the role of the MAPKKK17/18-ABI1 PP2C signalling module in regulating the cellular response to abscisic acid” / „Określenie roli modułu sygnalizacyjnego MAPKKK17/18/ABI1 PP2C w regulacji odpowiedzi komórkowej na kwas abscysynowy”, wykonanej przez Pana mgr Sivakumara Krishnamoorthyego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Rozprawa została przygotowana na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierunkiem prof. UAM dr hab. Agnieszki Ludwików, MBA.

Recenzja wykonana została w związku z prośbą Dziekan Wydziału Biologii UAM w Poznaniu, Pani prof. UAAM dr hab. Beaty Messyasz z dnia 16 lutego 2026, zgodnie z § 13 ust. 1 Uchwały nr 133/2020/2021 senatu Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 28 czerwca 2021 (z późn. zm.) dotyczącej określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora oraz Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z dnia 23 stycznia 2026 r.

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Przedmiotem ocenianej rozprawy było określenie funkcjonalnej roli elementów modułu sygnalizacyjnego powiązanego z kwasem abscysynowym (ABA), obejmującego kinazy MAPKKK17 i MAPKKK18, fosfatazę ABI1 oraz ligaz ubikwityny typu HECT: UPL4 i UPL6 w regulacji odpowiedzi komórkowej i rozwojowej *Arabidopsis thaliana*. Tematyka ta jest aktualna i dobrze osadzona w jednym z centralnych nurtów współczesnej biologii roślin, dotyczącym integracji sygnalizacji stresowej, regulacji hormonalnej oraz kontroli wzrostu i rozwoju roślin w warunkach stresu abiotycznego.

Rozprawa dotyczy problemu istotnego zarówno poznawczo, jak i potencjalnie aplikacyjnie. ABA jest kluczowym fitohormonem uczestniczącym w odpowiedzi roślin na suszę, zasolenie i inne stresy środowiskowe, jednak wiele aspektów integracji szlaku ABA z kaskadami MAPK oraz z układem ubikwityna-proteasom nadal pozostaje niewyjaśnionych. Doktorant podjął próbę uporządkowania tych zależności i wskazania punktów integracji między regulacją transkrypcyjną, posttranslacyjną i fenotypową. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę o mechanizmach równoważenia procesów wzrostu i adaptacji do stresu, a więc o zagadnieniu fundamentalnym także z perspektywy biologii funkcjonalnej roślin i przyszłych zastosowań hodowlanych.

Formalny aspekt rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa ma charakter klasycznej monografii doktorskiej. Praca liczy 157 stron i została przygotowana w języku angielskim. Zawiera również streszczenie w języku polskim. Układ pracy jest przejrzysty i obejmuje: wykaz skrótów, streszczenia, obszerny wstęp literaturowy, jasno sformułowane cele i hipotezy badawcze, szczegółowy opis materiału i metod, rozdział prezentujący wyniki, dyskusję, podsumowanie, wnioski oraz spisy figur i tabel. Do rozprawy dołączono także informację o finansowaniu badań oraz informację o publikacji obejmującej część prezentowanych wyników.

Od strony formalnej rozprawa została przygotowana starannie. Tytuł pracy trafnie oddaje jej zakres merytoryczny. Struktura jest logiczna, a przejścia między poszczególnymi częściami zachowują spójność wywodu. W pracy wykorzystano obszerną i dobrze dobraną literaturę przedmiotu. Na uwagę zasługuje szerokie osadzenie wyników własnych w aktualnym stanie wiedzy na temat sygnalizacji ABA, funkcjonowania kaskad MAPK i roli proteolizy zależnej od ubikwitynacji w odpowiedzi roślin na stres. W warstwie redakcyjnej występują pojedyncze uchybienia w cytowaniu literatury i niejedności formatowania opisów bibliograficznych. Przykładowo, w części Materiały i metody pozostawiono niedokończone zdanie „the upl4td lines were described.” bez wskazania źródła. Z kolei w części wynikowej pojawia się zapis „(Mitula; Tajdel-Zielińska et al.)”, w którym brakuje roku publikacji i pełnego zapisu pierwszego cytowania. W spisie literatury widoczne są także pozycje wymagające korekty redakcyjnej, np. „Nakagami Hirofumi, P. A. H. H. (2005)...” oraz „Brandt B, S. M. C. W. ... (2015)...”. W przypadku publikacji Teige et al. 2004 nota bibliograficzna jest niekompletna. Uchybienia te mają jednak charakter porządkowy i nie wpływają na ocenę merytoryczną wartości rozprawy.

Treść rozprawy i jej ocena merytoryczna

Wprowadzenie stanowi rzetelny i kompetentny przegląd literatury. Doktorant omawia podstawowe elementy sygnalizacji ABA, rolę fosfataz PP2C i kinaz SnRK2, a następnie przechodzi do kaskad MAPK, podkreślając miejsce MAPKKK17 i MAPKKK18 w odpowiedzi na stres abiotyczny. Cennym elementem tej części jest również przedstawienie zależności między sygnalizacją ABA i auksyny oraz omówienie znaczenia układu ubikwityna-proteasom dla kształtowania odpowiedzi komórkowej. Wstęp nie ma charakteru wyłącznie kompilacyjnego, lecz prowadzi do precyzyjnego zdefiniowania luki badawczej i dobrze uzasadnia podjęte cele pracy.

Cele badawcze zostały sformułowane jasno. Praca zmierzała do określenia, w jakim stopniu MAPKKK17 i MAPKKK18 pełnią funkcje odrębne, a w jakim redundantne w odpowiedzi na ABA, czy ABI1 i MAPKKK18 uczestniczą we wspólnej regulacji genów związanych z odpowiedzią auksynową oraz czy ligazy UPL4 i UPL6 są funkcjonalnie włączone w badany moduł sygnalizacyjny. Tak postawione pytania były logiczne, wzajemnie powiązane i odpowiadały rzeczywistej luce poznawczej.

Na szczególne podkreślenie zasługuje część metodyczna rozprawy. Doktorant zastosował wielowarstwowe podejście badawcze, łączące analizy transkryptomyczne RNA-seq, analizy różnicowej ekspresji genów, narzędzia bioinformatyczne służące interpretacji funkcjonalnej uzyskanych zbiorów danych, walidację wybranych obserwacji metodą RT-qPCR, a także testy fenotypowe prowadzone na liniach mutantów i roślinach z nadekspresją wybranych genów. Uwzględniono między innymi doświadczenia dotyczące wzrostu korzenia pierwotnego oraz rozwoju aparatów szparkowych. Taki dobór metod należy uznać za adekwatny do postawionych pytań badawczych, ponieważ umożliwiał przejście od poziomu zmian ekspresji genów do poziomu interpretacji funkcjonalnej i fenotypowej.

Dobór materiału badawczego oraz zastosowana metodologia są przemyślane. Zasadniczy trzon dowodowy oparto na poprawnie dobranym modelu genetycznym *Arabidopsis thaliana* oraz na analizie mutantów dla kluczowych komponentów badanego modułu. Istotnym walorem rozprawy jest zestawienie wyników analiz transkryptomicznych z oceną znaczenia biologicznego zidentyfikowanych zmian oraz z wynikami doświadczeń fenotypowych, co nadaje przedstawionym wnioskom większą spójność i siłę interpretacyjną. Jednocześnie trzeba zaznaczyć, że część wniosków ma charakter pośredni, gdyż wynika z korelacji pomiędzy profilem ekspresji, analizą kategorii funkcjonalnych i obserwowanym fenotypem, a nie z bezpośredniego wykazania interakcji białkowych czy identyfikacji substratów badanych ligaz. Nie jest to jednak wada dyskwalifikująca, lecz raczej naturalna konsekwencja szerokiego, eksploracyjno-funkcjonalnego charakteru rozprawy.

Analizy fenotypowe przeprowadzone w rozprawie obejmowały przede wszystkim test elongacji korzenia pierwotnego w warunkach kontrolnych i po zastosowaniu egzogenego ABA, jak również ocenę rozwoju aparatów szparkowych z uwzględnieniem stomatal index, liczby komórek szparkowych, liczby niespecjalizowanych komórek epidermy oraz organizacji epidermy w liścieniach i młodych liściach. Zastosowany bodziec eksperymentalny miał charakter przede wszystkim hormonalny, a nie środowiskowy. Rośliny traktowano ABA jako głównym czynnikiem indukującym odpowiedź stresową i rozwojową, podczas gdy bezpośrednich testów fenotypowych w warunkach suszy, zasolenia, chłodu czy stresu osmotycznego w pracy nie przeprowadzono. Dobór tych analiz należy ocenić jako zasadniczo prawidłowy i spójny z celem pracy, ponieważ zarówno wzrost korzenia, jak i rozwój aparatów szparkowych należą do klasycznych, biologicznie trafnych fenotypów odpowiedzi zależnej od ABA u *Arabidopsis*. Z recenzenckiego obowiązku warto jednak zaznaczyć, że zakres fenotypowania był stosunkowo wąski i koncentrował się na wybranych efektach rozwojowych, przez co część dalej idących wniosków o znaczeniu badanych regulatorów w szerszej odpowiedzi na stres abiotyczny opiera się bardziej na dobrze uzasadnionej inferencji niż na bezpośrednim potwierdzeniu fenotypowym. Ponadto w opisie metod i wyników pojawia się pewna niespójność liczebności prób w teście korzeniowym: opis metod mówi o 15–18 siewkach na genotyp na replikację, natomiast opis wyników podaje $n = 50$, co zapewne oznacza dane zagregowane z kilku doświadczeń, ale warto byłoby to doprecyzować.

Na szczególne podkreślenie zasługuje prawidłowy i metodycznie uzasadniony dobór metod bioinformatycznych zastosowanych w części transkryptomicznej rozprawy. Autor przedstawił spójny pipeline analityczny, obejmujący ocenę jakości RNA, przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie, analizę surowych odczytów, mapowanie i wstępne przetwarzanie danych, składanie transkryptów, kwantyfikację ekspresji, analizę różnicowej ekspresji, adnotację funkcjonalną genów oraz analizy porównawcze i funkcjonalne. Za właściwe należy uznać zastosowanie programu Salmon do kwantyfikacji ekspresji oraz pakietu DESeq2 do identyfikacji genów różnicująco ekspresjonowanych, przy przyjęciu jednoznacznych kryteriów statystycznych opartych na skorygowanej wartości p i prognozy zmiany ekspresji. Trafnym elementem pipeline'u było również wykorzystanie analizy PCA do oceny rozkładu próbek oraz analizy wzbogacenia funkcjonalnego w celu biologicznej interpretacji uzyskanych zbiorów genów. Na uwagę zasługuje także zastosowanie analizy RRHO2, która umożliwiła bezprogowe porównanie odpowiedzi transkryptomicznych między badanymi genotypami oraz lepsze uchwycenie zarówno elementów wspólnych, jak i swoistych dla analizowanych kinaz. Istotnym dopełnieniem części obliczeniowej była walidacja wybranych wyników metodą RT-qPCR oraz ich odniesienie do doświadczeń fenotypowych.

Autor zastosował dwa geny referencyjne, 18S rRNA i ACT2, co samo w sobie należy ocenić korzystnie, ponieważ ogranicza ryzyko błędu wynikającego z oparcia normalizacji na pojedynczym transkrypcie. W rozprawie nie przedstawiono jednak odrębnej walidacji stabilności ekspresji tych genów w analizowanym układzie doświadczalnym. Z opisu wynika raczej, że ich dobór oparto na wcześniejszej procedurze literaturowej. Stanowi to pewne ograniczenie metodologiczne, choć nie podważa zasadniczo wiarygodności uzyskanych wyników qPCR.

Całość zastosowanego postępowania analitycznego należy ocenić jako poprawną, logicznie uporządkowaną i adekwatną do postawionych celów badawczych, choć niektóre parametry poszczególnych etapów analizy mogłyby zostać opisane bardziej szczegółowo.

Wyniki rozprawy zaprezentowano na 32 rycinach i w 16 tabelach.

Na uznanie zasługuje sposób interpretacji wyników. Doktorant nie ogranicza się do przedstawienia list genów różnicowanie eksprymowanych, lecz podejmuje próbę syntetycznego ujęcia uzyskanych danych i osadzenia ich w szerszym kontekście biologii stresu, rozwoju roślin i interakcji hormonalnych.

W rozprawie wykazano, że MAPKKK17 i MAPKKK18, mimo bliskiego pokrewieństwa, pełnią role tylko częściowo wspólne. Analizy transkryptomocne wskazały, że MAPKKK17 jest silniej związana z regulacją metabolizmu RNA i procesów potranskrypcyjnych w odpowiedzi na ABA, natomiast MAPKKK18 wiąże się w większym stopniu z procesami rozwojowymi, w tym z plastycznością organów i regulacją rozwoju aparatów szparkowych. Stwierdzono ponadto, że obie kinazy oddziałują na częściowo wspólną pulę genów zaangażowanych w transport jonów, sygnalizację jasmonianową oraz regulację funkcji aparatów szparkowych, co może świadczyć o częściowym nakładaniu się zakresu ich działania i sugeruje istnienie ograniczonej redundancji funkcjonalnej.

Za najważniejsze osiągnięcie doktoranta uważam przedstawienie spójnego, wielowarstwowego modelu, w którym moduł MAPKKK17/18-ABI1 oraz ligazy UPL4 i UPL6 współuczestniczą w koordynacji odpowiedzi rośliny na ABA na poziomie transkryptomocnym, rozwojowym i fenotypowym. Wartość tego osiągnięcia polega nie tylko na identyfikacji pojedynczych zależności, lecz przede wszystkim na integracji kilku poziomów regulacji w jedną koncepcję biologiczną. Doktorant wykazał, że odpowiedź ABA nie jest wyłącznie prostą ścieżką sygnalizacyjną, ale siecią zależności obejmującą kontrolę ekspresji genów, relacje z sygnalizacją auksynową oraz prawdopodobny komponent proteolityczny wpływający na kształtowanie cech rozwojowych.

Na odrębne podkreślenie zasługuje część pracy dotycząca zależności ABA-auksyna. Zidentyfikowane zmiany w ekspresji genów z rodzin SAUR, Aux/IAA i PIN wspierają interpretację, zgodnie z którą odpowiedź ABA obejmuje tłumienie programów wzrostowych zależnych od auksyny. Jest to wniosek istotny, ponieważ rozszerza dotychczasowe rozumienie antagonizmu ABA-auksyna i wskazuje, że

ABI1 oraz MAPKKK18 mogą uczestniczyć w organizacji wspólnych modułów regulacyjnych dla odpowiedzi stresowej i rozwojowej.

W rozprawie sformułowano zasadniczo dwa wnioski, chociaż więcej stwierdzeń o charakterze wniosków znalazło się w rozdziale 6 „Summary”. Doktorant wnioskuje, że kinaza MAPKKK17 jest silnie powiązana z procesami dotyczącymi metabolizmu RNA i regulacji potranskrypcyjnej w odpowiedzi na ABA. Trzeba jednak zaznaczyć, że jest to wniosek wyprowadzony głównie z analiz wzbogacenia funkcjonalnego i z układu genów różnicowanie eksprymowanych, a nie z bezpośrednich pomiarów splicingu, stabilności mRNA czy efektywności translacji. Oznacza to, że kierunek interpretacji jest dobrze uzasadniony, choć jego mechanistyczne doprecyzowanie wymagałoby dalszych badań. W odniesieniu do MAPKKK18 zasadny jest wniosek o związku tej kinazy z regulacją procesów rozwojowych i plastyczności wzrostu w warunkach działania ABA. Zgromadzone dane wskazują na powiązanie tej kinazy z programami związanymi z rozwojem organów, proliferacją komórek i aparatem szparkowym. Również tutaj trzeba podkreślić, że część argumentacji ma charakter pośredni i została oparta głównie na analizach transkryptomicznych, jednak spójność tych obserwacji z wynikami fenotypowymi sprawia, że wniosek ten należy uznać za dobrze umotywowany. Za dobrze udokumentowany należy uznać wniosek o częściowo redundantnej roli MAPKKK17 i MAPKKK18 w odpowiedzi na ABA. Wykazanie częściowo wspólnej puli genów różnicująco eksprymowanych oraz zbieżnego kierunku zmian ich ekspresji w analizach porównawczych wskazuje, że obie kinazy uczestniczą we współregulacji określonego zakresu odpowiedzi na ABA. Jednocześnie nie są to funkcje w pełni tożsame, ponieważ każda z tych kinaz zachowuje również odrębność działania, widoczną w regulacji swoistych grup genów i procesów biologicznych. W podobny sposób należy rozpatrywać wniosek odnoszący się do udziału ABI1 i MAPKKK18 w supresji programów zależnych od auksyny indukowanej przez ABA. Zbieżność zmian ekspresji wskazuje na realny współdział obu elementów w tej części odpowiedzi komórkowej. Nie wykazano jednak bezpośrednio mechanizmu tej koordynacji, w szczególności poprzez analizy epistazy, mutantów podwójnych lub bezpośrednich interakcji, dlatego bardziej ostrożne byłoby mówienie o funkcjonalnym współdziałaniu niż o pełnym potwierdzeniu mechanistycznej współregulacji. Najbardziej dyskusyjny, ale zarazem bardzo interesujący, jest wniosek dotyczący UPL4 i UPL6. Wyniki fenotypowe oraz obserwacje ekspresyjne przekonująco wskazują na ich udział w odpowiedzi na ABA i w regulacji cech rozwojowych, zwłaszcza wzrostu korzenia i kształtowania aparatów szparkowych. Słabiej udokumentowana pozostaje natomiast część interpretacji zakładająca, że efekt ten jest realizowany przez bezpośrednią, ukierunkowaną degradację określonych białek docelowych. Taki mechanizm jest biologicznie prawdopodobny, lecz w obecnej rozprawie nie został zweryfikowany eksperymentalnie na poziomie biochemicznym. Nie osłabia to

wartości wyników, ale wskazuje wyraźnie, gdzie przebiega granica między twardym wnioskiem a hipotezą wymagającą dalszego sprawdzenia.

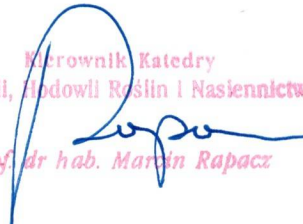
Rozprawa opiera się na obszernym piśmiennictwie, obejmującym około 370 pozycji. Dobór literatury należy ocenić jako właściwy i w znacznej mierze aktualny. Uwzględniono zarówno prace fundamentalne dla sygnalizacji ABA i kaskad MAPK, jak i nowsze publikacje bezpośrednio związane z rolą MAPKKK17/18, ABI1 oraz ligaz ubikwityny typu HECT, w tym pozycje z lat 2024-2025. Nie stwierdzono pominięcia oczywistych, kluczowych prac, które osłabiałyby podstawę literaturową rozprawy.

Wniosek końcowy

Przedłożona rozprawa doktorska jest wartościowym i dojrzałym opracowaniem naukowym, wnoszącym istotny wkład do poznania mechanizmów integracji sygnalizacji ABA z kaskadami MAPK, regulacją hormonalną oraz procesami proteolizy zależnej od ubikwitynacji. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury, umiejętnością samodzielnego planowania i prowadzenia badań oraz kompetencją w interpretacji złożonych danych transkryptomicznych i fenotypowych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana mgr Sivakumara Krishnamoorthyego spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne oraz potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

W związku z powyższym opiniuję rozprawę jednoznacznie pozytywnie i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie Pana mgr Sivakumara Krishnamoorthyego do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Kierownik Katedry
Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

prof. dr hab. Marcin Rapacz