SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Warszawa, 20.04.2026 r.

dr hab. Urszula Zajączkowska, prof. SGGW

Samodzielny Zakład Botaniki Leśnej
Instytut Nauk Leśnych
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Deeksha Singh

pt. „The Role of PHLOEM EARLY DOF transcription factors (PEARs) in Plasmodiophora brassicae-driven phloem reprogramming in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh."

1. Podstawa formalna opracowania recenzji

Podstawę formalną sporządzenia niniejszej recenzji stanowi Uchwała nr 4/K/2026 Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk z dnia 6 marca 2026 r. w sprawie wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej Pani mgr Deeksha Singh. Zostałam powołana do pełnienia funkcji recenzenta na podstawie § 4 ust. 13 lit. e) Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora, doktora habilitowanego i tytułu profesora w IGR PAN, przyjętego uchwałą Rady Naukowej IGR PAN nr 4/IV/202023 z dnia 22 listopada 2023 r. Ocena rozprawy została sporządzona z uwzględnieniem wymagań określonych w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w szczególności kryteriów odnoszących się do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego, wykazania ogólnej wiedzy teoretycznej Pani mgr Singh oraz jej umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Nauk Leśnych
Samodzielny Zakład Botaniki
Leśnej

ul. Nowoursynowska 159
02–776 Warszawa
+48 22 593 80 21
szbl@sggw.edu.pl
www.sggw.pl

2. Ogólna charakterystyka rozprawy

Oceniana rozprawa została przygotowana w formie cyklu powiązanych tematycznie publikacji naukowych, opatrzonego wprowadzeniem, częścią metodyczną, interpretacją i podsumowaniem. Na cykl składają się dwa oryginalne artykuły naukowe:

Singh D., Blicharz S., Stefanowicz K., Ragni L., Michalak K., Bagniewska-Zadworna A., Malinowski R., *Combining Clearing and Fluorescence Microscopy for Visualising Changes in Gene Expression and Physiological Responses to Plasmodiophora brassicae*, Journal of Visualized Experiments, 2022, 186, IF = 1.2, 70 pkt.

Singh D., Blicharz S., Roszak P., Helariutta Y., Malinowski R., *PHLOEM EARLY DOF genes are induced within clubroot galls as a consequence of cambial stimulation and vascular reprogramming during Plasmodiophora brassicae infection in Arabidopsis thaliana*, Journal of Experimental Botany, 2025, 76(16): 4521–4537, IF = 5.7, 140 pkt.

Rozprawa zawiera wykaz skrótów, streszczenia w języku angielskim i polskim, wprowadzenie, hipotezy badawcze i cele pracy, opis materiałów i metod, wyniki połączone z dyskusją, wnioski, perspektywy badawcze, wykaz literatury, oświadczenia współautorów oraz kopie publikacji. Układ całości jest logiczny. Część opisowa dobrze integruje oba artykuły i pozwala odczytać ich wspólną oś problemową.
Tematyka pracy dotyczy mechanizmów przeprogramowania tkanek naczyniowych podczas infekcji *Plasmodiophora brassicae* u *Arabidopsis thaliana*, ze szczególnym uwzględnieniem roli czynników transkrypcyjnych z grupy PHLOEM EARLY DOF. Jest to zagadnienie istotne poznawczo, ponieważ dotyka podstawowych mechanizmów interakcji roślina–patogen, a zarazem odnosi się do choroby o znacznych konsekwencjach gospodarczych.

3. Ocena doboru problemu badawczego i celu pracy

Pani mgr Singh podjęła problem, który leży na przecięciu dwóch nierówno opisanych zjawisk: patogenezy kiły kapusty i regulacji tożsamości komórkowej w linii floemowej. Każde z nich ma własną literaturę, ale ich wspólny punkt, czyli to, w jaki sposób patogen przejmuje kontrolę nad programem rozwojowym tkanki przewodzącej, pozostawał niezbadany na poziomie

molekularnym. Punktem wyjścia stało się zjawisko silnego przeprogramowania układu naczyniowego gospodarza podczas rozwoju kiły kapusty, obejmujące supresję dojrzewania ksylemu oraz nasilony rozwój floemu. Sformułowana hipoteza zakłada, że za ten proces odpowiadają regulatory działające wcześniej w hierarchii linii floemowej, a więc wyżej niż geny różnicowania końcowego. Cel pracy został określony klarownie i dwuczłonowo: z jednej strony opracowanie warsztatu do obrazowania zmian zachodzących w gęstych, słabo przejrzystych naroślach, z drugiej funkcjonalna analiza roli genów PEAR w proliferacji floemu indukowanej przez patogen. Taki układ jest trafny, ponieważ część metodyczna nie była traktowana jak dodatek techniczny, lecz jako zasadniczy warunek przeprowadzenia właściwych analiz biologicznych.

4. Ocena materiału, metod i warsztatu badawczego

Jednym z wyraźnych atutów tej rozprawy jest sposób prowadzenia badań. Pani mgr Singh swobodnie porusza się między różnymi podejściami eksperymentalnymi, łącząc obserwacje mikroskopowe z analizą linii reporterowych i pracą na mutantach o różnym stopniu złożoności. Uzupełniła to ilościową analizą obrazów oraz doświadczeniami z inhibitorami wpływającymi na równowagę auksyn. Każde z tych narzędzi odpowiada na inne pytanie, a razem układają się w jeden argument. Na szczególną uwagę zasługuje optymalizacja procedury fluorescencyjnego obrazowania w złożonych, nieprzezroczystych naroślach. Każdy, kto pracuje na gęstych tkankach roślinnych, szczególnie drewnie, wie, że ich nieprzezroczystość i autofluorescencja potrafią skutecznie uniemożliwić sensowną interpretację obrazu. Połączenie metody ClearSee z odpowiednim utrwalaniem, cięciem i kompatybilnymi barwieniami uważam za cenne i twórcze dostosowanie do biologicznie trudnego układu. Rozwiązanie ma znaczenie także poza tą rozprawą. Badania prowadzone były na mutantach poczwórnych i pięciokrotnych, co wymagało zarówno dobrej znajomości biologii rozwoju roślin, jak i dużej dyscypliny eksperymentalnej. Wyniki były analizowane nie tylko jakościowo, ale i ilościowo, z pomiarami anatomicznymi i porównaniami statystycznymi. Z oświadczeń współautorów wynika, że mgr Deeksha Singh odegrała wiodącą rolę w obu publikacjach: projektowała doświadczenia, wykonywała eksperymenty, przygotowywała materiał do analiz mikroskopowych, prowadziła obrazowanie, analizę danych i pisała pierwotne wersje manuskryptów. Zakres ten świadczy o rzeczywistej samodzielności badawczej.

5. Ocena wyników i ich znaczenia naukowego

Najważniejszy wynik tej pracy polega na tym, że geny PEAR, mimo wyraźnej indukcji w naroślach, nie są konieczne dla proliferacji floemu wywołanej przez patogen. Wynik ten rozdziela zmianę ekspresji od rzeczywistej roli genów. Wzrost aktywności genów PEAR jest następstwem głębszego przeprogramowania tkanek i zmian w aktywności kambium, nie zaś bezpośrednim mechanizmem wymuszania nadprodukcji floemu.
Indukcja genów PEAR, w tym DOF6 i PEAR1, została wykazana przy użyciu linii reporterowych w tkankach narośli na etapie proliferacyjnym. W roślinach zakażonych ekspresja pDOF6, w warunkach kontrolnych ograniczona do skupisk komórek floemowych CP+CPP, ulegała rozszerzeniu i pojawiała się także w komórkach parenchymatycznych ksylemu. W przypadku PEAR1 sygnał obejmował zarówno inicjały floemowe wywodzące się z kambium, jak i skupiska CP+CPP. Obserwacje te wskazują na zmianę przestrzennego wzorca aktywności promotorów związanych z linią floemową.

W celu weryfikacji funkcjonalnej tej indukcji zastosowano serię mutantów od pojedynczych do wielokrotnych. Mutanty wyższego rzędu wykazywały w warunkach kontrolnych obniżoną liczbę komórek w skupiskach CP+CPP. Pomimo tego zakażenie patogenem indukowało w nich ektopową proliferację floemu o sile porównywalnej, a w ujęciu względnym wyższej niż w roślinach dzikich. Wskazuje to, że patogen uruchamia proliferację floemu mechanizmami niezależnymi od genów PEAR, a ich indukcja odzwierciedla raczej zmiany w przebiegu różnicowania potomnych komórek kambium.

Istotnym elementem pracy jest uchwycenie zmian hormonalnych towarzyszących rozwojowi narośli. Z użyciem linii reporterowych wykazano spadek sygnalizacji cytokininowej w rejonie kambium oraz nasilenie sygnalizacji auksynowej w jego zewnętrznych warstwach i w obrębie proliferujących skupisk CP+CPP. Zaburzenie równowagi auksyna–cytokinina zostało tu pokazane z rozdzielczością tkankową.
Aby sprawdzić, czy auksyna bezpośrednio reguluje indukcję genów PEAR, zastosowano inhibitory biosyntezy, transportu i sygnalizacji auksyn. Zaburzały one anatomię układu naczyniowego i wzorce różnicowania, jednak nie prowadziły do obniżenia aktywności promotora DOF6 w zakażonych tkankach. Wyniki te wzmacniają wniosek, że aktywacja genów PEAR nie

wynika z pojedynczego sygnału hormonalnego, lecz z szerszego przeprogramowania aktywności kambium i zmian w homeostazie hormonalnej wywoływanych przez patogen.
Pierwszy artykuł, poświęcony optymalizacji procedury obrazowania, ma znaczenie także dla innych badaczy pracujących na podobnych układach, a nie wyłącznie dla tej konkretnej pracy.

6. Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Rozprawa jest przygotowana starannie i nie budzi zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych. Część opisowa jest napisana jasno, zestawienie wyników z obu publikacji przemyślane, a materiał ilustracyjny precyzyjny i funkcjonalny.

Uwagi, które zgłaszam, mają więc jedynie charakter dyskusyjny.

Pierwsza dotyczy napięcia między rolą cytokinin a obserwowaną indukcją genów PEAR. W warunkach fizjologicznych cytokininy są uznanymi regulatorami ekspresji PEAR podczas prymowania kambium do produkcji komórek linii floemowej. Tymczasem w naroślach sygnalizacja cytokininowa jest wyraźnie osłabiona, co zostało dobrze udokumentowane zarówno reporterami TCS::GFP, jak i pARR5::GFP, a mimo to geny PEAR ulegają silnej indukcji. Praca zauważa to napięcie i wyciąga z niego trafny wniosek, że indukcja PEAR nie jest zależna od cytokininy w kontekście zakażenia. Nie wskazuje jednak regulatora działającego powyżej. Jest to naturalne ograniczenie zakresu pracy, ale jednocześnie jeden z najciekawszych otwartych problemów, który z niej wynika.

Druga uwaga dotyczy interpretacji eksperymentów z inhibitorami chemicznymi. Traktowania substancjami zakłócającymi biosyntezę, transport i sygnalizację auksyn dawały wyraźne fenotypy anatomiczne i zmieniały wzorzec ekspresji pDOF6::erVenus, nie blokowały jednak podwyższonej aktywności tego promotora w zakażonych tkankach. Wniosek o braku bezpośredniej regulacji auksynowej jest zasadny, jednak wszystkie zastosowane inhibitory działały przecież na całą roślinę, obejmując zarówno tkanki zakażone, jak i zdrowe, co utrudnia jednoznaczne oddzielenie ich wpływu na regulację PEAR od pośrednich efektów anatomicznych wynikających z zaburzenia całego programu naczyniowego. Nie jest to zarzut metodyczny, lecz ograniczenie rozdzielczości

interpretacji, które może stanowić punkt wyjścia dla bardziej tkankoswoistych podejść w dalszych badaniach.

Trzecia uwaga odnosi się do najdalej idącej hipotezy biologicznej sformułowanej w pracy. Sugeruje ona, że *Plasmodiophora* może działać na poziomie bifacjalnego kambium, przed specyfikacją wspólnych progenitorów ksylemu i floemu, destabilizując homeostazę kambialną, której zewnętrznym przejawem jest ektopowa proliferacja floemu i supresja ksylogenezy. Hipoteza ta zasługuje na wyraźniejsze osadzenie już w dyskusji, nie tylko w perspektywach. Jeśli patogen rzeczywiście działa na tym poziomie, przesuwa to zasadniczo punkt ciężkości całego zagadnienia: nie chodzi o to, które geny floemowe są regulowane, lecz o to, w jaki sposób zakłócana jest decyzja komórkowa poprzedzająca ich aktywację.

Z perspektywy anatomii drewna i funkcjonowania kambium interesujące byłoby dalsze rozwinięcie tej hipotezy w kierunku relacji między proliferacją floemu a jednoczesnym zahamowaniem różnicowania elementów ksylemu. W badaniach nad drzewami zmiany w aktywności kambium i przesunięcia równowagi między produkcją floemu i ksylemu są ściśle powiązane z regulacją gradientów hormonalnych oraz warunkami mechanicznymi i transportowymi. Ujęcie obserwowanych w pracy zjawisk w tym szerszym kontekście mogłoby pomóc w lepszym zrozumieniu, czy działanie patogenu polega na selektywnym pobudzeniu jednej linii komórkowej, czy raczej na globalnym rozregulowaniu funkcjonowania kambium jako merystemu odpowiedzialnego za wytwarzanie obu typów tkanek przewodzących.

7. Wniosek końcowy

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Deeksha Singh stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Potwierdza szeroką wiedzę teoretyczną Pani mgr Singh w zakresie biologii rozwoju roślin, anatomii funkcjonalnej i interakcji roślina-patogen, a zarazem jednoznacznie pokazuje zdolność do samodzielnego prowadzenia badań.
Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Deekshy Singh spełnia wymagania określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę o dopuszczenie mgr Deekshy Singh do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO

Warszawa, 20.04.2026 r.

Z uwagi na wysoki poziom merytoryczny pracy, wyraźną samodzielność badawczą Pani mgr Singh, wkład metodyczny wykraczający poza potrzeby samej rozprawy, publikację wyników w uznanych czasopismach międzynarodowych oraz spójną konstrukcję całego projektu, wnoszę ponadto o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Deekshy Singh.

Urszula Zajączkowska

dr hab. Urszula Zajączkowska, prof. SGGW