



dr hab. Małgorzata Garnczarska, prof. UAM  
Zakład Fizjologii Roślin  
Wydział Biologii  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza  
61-614 Poznań, ul. Umultowska 89

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Justyny Fidler  
„Udział genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu kwasu abscysynowego  
w regulacji spoczynku ziarniaków pszenżyta (*x Triticosecale* Wittm.)”**

Praca doktorska mgr Justyny Fidler została wykonana w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego. Promotorem pomocniczym pracy jest dr Edyta Zdunek-Zastocka. W Katedrze od wielu lat prowadzone są badania nad biochemicznymi aspektami produkcji roślin uprawnych. Jednym z czynników ograniczających produkcję zbóż jest proces przedzmiwnego porastania, w którym dochodzi do kiełkowania ziarniaków znajdujących się w kłosie, na skutek przedwczesnego przełamania spoczynku. Kwas abscysynowy (ABA) jest hormonem odgrywającym kluczową rolę w regulacji spoczynku i kiełkowaniu nasion.

Podjęcie ważnego zagadnienia dotyczącego wpływu zróżnicowanej zdolności ziarniaków do biosyntezy i katabolizmu ABA podczas dojrzwania i kiełkowania na podatność zbóż na porastanie uważam za zasadne i pożądane. Porastanie zbóż przynosi znaczne straty gospodarcze spowodowane obniżeniem ilości plonów i pogorszeniem wartości ziarna. Tematyka badań ma nie tylko wartość poznawczą, ale również potencjalnie aplikacyjną. Poznanie molekularnych i biochemicznych podstaw porastania zbóż może w przyszłości przyczynić się do opracowania kryteriów selekcji odmian o zwiększonej odporności na przedzmiwne porastanie.

Rozprawa doktorska mgr Justyny Fidler jest opracowaniem napisanym w języku polskim, zawartym na 127 stronach maszynopisu, zilustrowanym 39 rycinami i 11 tabelami, a cytowana literatura obejmuje 155 pozycji. Praca zawiera streszczenie wyników w języku polskim i angielskim, a także podsumowanie i wnioski. Doktorantka przygotowała rozprawę niezwykle starannie.

Rozprawę rozpoczyna zwięzły wstęp wprowadzający w tematykę pracy. Oprócz ogólnych wiadomości o rozwoju ziarniaków zbóż, spoczynku i kiełkowaniu nasion, omówiono czynniki regulujące spoczynek i kiełkowanie, w tym hormonalną regulację spoczynku i kiełkowania. Następnie Doktorantka omawia metabolizm kwasu abscysynowego, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji metabolizmu ABA w wykształcających się, dojrzewających i kiełkujących ziarniakach.



Cel pracy został jasno sformułowany. Aby go osiągnąć, to jest wyjaśnić, czy zróżnicowana zdolność ziarniaków do biosyntezy i katabolizmu ABA w trakcie ich dojrzewania i kiełkowania jest jednym z czynników decydujących o głębokości spoczynku ziarniaków pszenżyta, Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła szereg analiz stosując odpowiednio dobrane metody szczegółowo opisane w rozdziale Materiał i metody. Materiał doświadczalny stanowiły dwie odmiany pszenżyta ozimego Leontino i Fredro różniące się podatnością na przedźniwne porastanie. Analizy przeprowadzono na ziarniakach rozwijających się w warunkach kontrolnych i indukowanego przedźniwnego porastania. Imbibicji poddawano dojrzewające ziarniaki, ziarniaki zebrane w okresie dojrzałości pełnej oraz ziarniaki poddane późniwnemu dojrzewaniu. Badano kiełkowanie nasion, zawartość ABA i ekspresję genów zaangażowanych w jego metabolizm. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę funkcjonalną wytypowanych genów poprzez ich nadekspresję w tytoniu. Zrealizowanie zaplanowanych badań wymagało wykorzystania szerokiego wachlarza metod i technik badawczych (izolacja DNA i RNA, wykorzystanie narzędzi bioinformatycznych, ilościowy RT-PCR, otrzymywanie transformantów). Takie wszechstronne podejście do badanego problemu, wymagające dużej sprawności doświadczalnej, bardzo dobrze świadczy o umiejętnościach Doktorantki i jej przygotowaniu do pracy badawczej.

W rozdziale Wyniki Doktorantka przedstawiła kolejne etapy swojej pracy dokumentując uzyskane rezultaty licznymi rycinami obrazującymi wyniki przeprowadzonych analiz. W pierwszym etapie zidentyfikowała w ziarniakach pszenżyta dwie sekwencje cDNA dioksygenazy 9-cis-epoksykarotenoidowej pszenżyta, *TsNCED1* i *TsNCED2*, enzymu szlaku biosyntezy kwasu abscysynowego oraz dwie sekwencje cDNA 8'-hydroksylazy ABA pszenżyta, *TsABA8'OH1* i *TsABA8'OH2*, enzymu szlaku katabolizmu ABA. W sekwencjach aminokwasowych obu *TsNCED* stwierdziła obecność motywów silnie konserwatywnych występujących w białkach z rodziny dioksygenaz karotenoidów oraz aminokwasów kluczowych do zapewnienia specyficzności substratowej względem 9-cis- karotenoidów. Sekwencje aminokwasowe *TsABA8'OH* zawierały motywy charakterystyczne dla białek z rodziny cytochromów P450. Doktorantka zidentyfikowała także fragmenty sekwencji nukleotydomowych epoksydazy zeoksantynowej (*TsZEPI*) i UDP-glikozylotransferazy (*TsUGT1*).

W dalszym etapie pracy Doktorantka analizowała zawartość ABA w ziarniakach podczas dojrzewania w warunkach kontrolnych, jak również sprzyjających porastaniu i stwierdziła wyższą zawartość ABA w ziarniakach odmiany Fredro, o mniejszej podatności na przedźniwne porastanie. Wyższa zawartość ABA w ziarniakach odmiany Fredro była związana z bardziej intensywną biosyntezą tego fitohormonu z udziałem zarówno *TsNCED1* jak i *TsNCED2*, co potwierdziły analizy profili ekspresji obu genów.

W ziarniakach zebranych w okresie dojrzałości pełnej i poddanych pęcznieniu, wzmożony katabolizm ABA, związany z wysokim poziomem transkryptu *TsABA8'OH1* oraz *TsABA8'OH2*, powodował ustąpienie spoczynku ziarniaków odmiany Leontino. W ziarniakach odmiany Fredro wyższa zawartość ABA i utrzymywanie spoczynku były skorelowane z wyższą ekspresją genu *TsNCED1*.

Doktorantka wykazała, że późniejsze dojrzewanie nie wpływało na zawartość ABA w suchych ziarniakach, ale po poddaniu ziarniaków pęcznieniu obserwowano zmianę tempa metabolizmu tego fitohormonu, zwłaszcza w odmianie Fredro. Przejściowy spadek poziomu ekspresji *TsNCED1* w pierwszych dwóch godzinach pęcznienia, któremu towarzyszył podwyższony poziom transkryptu *TsABA8'OH1* począwszy od drugiej godziny pęcznienia, prowadził do znacznego obniżenia zawartości ABA na początkowym etapie pęcznienia oraz ustąpienia spoczynku ziarniaków tej odmiany. Profile ekspresji *TsABA8'OH1* oraz *TsABA8'OH2* wskazują na udział obydwu genów w obniżaniu zawartości ABA po imbibicji.

Heterologiczna ekspresja genów pszenżyta zaangażowanych w metabolizm ABA wskazuje na udział *TsNCED1* w regulacji biosyntezy ABA, gdyż nasiona transgenicznych roślin tytoniu z nadekspresją tego genu charakteryzowały się wyższą zawartością ABA w porównaniu z nasionami roślin typu dzikiego. Nasiona z roślin transformowanych, wykazywały obniżoną zdolność do kiełkowania do 6 dnia od rozpoczęcia imbibicji, co wskazuje na udział *TsNCED1* w regulacji spoczynku.

Szczegółowy komentarz uzyskanych rezultatów znajduje się w rozdziale Dyskusja. Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki wskazują, że zawartość ABA, wynikająca ze zróżnicowanej zdolności ziarniaków do metabolizmu ABA, może być jednym z czynników warunkujących głębokość spoczynku ziarniaków pszenżyta i podatność na porastanie, zarówno podczas dojrzewania ziarniaków, jak i pęcznienia.

Po przeczytaniu pracy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania do Doktorantki.

1. We Wstępie, wprowadzając w zagadnienia dotyczące hormonalnej regulacji spoczynku i kiełkowania nasion, wspomina Pani, że przełamaniu spoczynku towarzyszy obniżenie zawartości i/lub wrażliwości na ABA. Ponieważ temat wrażliwości nasion na ABA został potraktowany niezwykle skrótowo, prosiłbym o jego rozszerzenie i przedstawienie informacji, jak odbywa się percepcja i transdukcja sygnału ABA w nasionach.
2. Dlaczego po wstępnych oznaczeniach ekspresji UDP-glukozylotransferazy w dojrzewających ziarniakach nie badała Pani poziomu transkryptu tego genu podczas kiełkowania nasion?
3. Odczuwam pewien niedosyt po lekturze wyników dotyczących heterologicznej ekspresji *TsNCED1* w roślinach tytoniu. Dlaczego analizy zawartości ABA w nasionach tytoniu przeprowadziła Pani tylko do 6 godz., a testy kiełkowania do 10 godz. od momentu rozpoczęcia pęcznienia? Moje wątpliwości budzi oznaczanie zawartości ABA w nasionach tytoniu podczas pęcznienia w przeliczaniu na świeżą masę. Świeża masa nasion to parametr, który podlega dynamicznym zmianom podczas procesu pęcznienia.
4. Na rycinach z profilami ekspresji badanych genów Doktorantka przedstawia próbę reprezentatywną, a w omówieniu posługuje się opisem wartościującym (np. wyższy poziom ekspresji). Czy uzyskane wyniki rzeczywiście zostały oszacowane choćby półilościowo, np. densytometrycznie, czy też jest to raczej jedynie oszacowanie wizualne?



Chciałabym zatem, poprosić o omówienie tych zagadnień w trakcie obrony rozprawy doktorskiej.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że rozprawa mgr Justyny Fidler ma charakter oryginalnej pracy naukowej i spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawie doktorskiej. Autorka wykazała duże kompetencje merytoryczne i dobrą znajomość literatury dotyczącej opracowywanego tematu, dobre opanowanie różnorodnych metod badawczych oraz umiejętność krytycznej oceny uzyskanych wyników. Układ pracy, a zwłaszcza dobór odpowiednich obiektów badawczych i metod oraz sekwencja przeprowadzonych analiz dowodzą, że badania zaplanowano i wykonano z pełną świadomością osiągnięcia założonych celów. Wobec powyższego wnoszę do Rady Wydziału Biologii i Rolnictwa SGGW o dopuszczenie Pani mgr Justyny Fidler do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na nowatorski charakter badań, staranność planowania i wykonania doświadczeń, a także jakość dokumentacji uzyskanych wyników, chciałabym prosić Wysoką Radę, by, uwzględniając przebieg obrony, rozważyła możliwość wyróżnienia mgr Justyny Fidler stosowną nagrodą.

Poznań, 30 maja 2017 r.

/dr hab. Małgorzata Garneczarska, prof. UAM/