

Warszawa, dnia 30 maja 2017r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

pt: "Udział genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu kwasu abscysynowego w regulacji spoczynku ziarniaków pszenżyta (*x Triticosecale* Wittm.)"

wykonanej przez **mgr Justynę Fidler**

pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Bielawskiego

w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie

1. Uwagi ogólne

Zagadnienie regulacji spoczynku i kiełkowania nasion jest od lat przedmiotem intensywnych badań wielu pracowni fizjologii i biochemii roślin. Szczególnie istotny jest obszar badań dotyczący porostania zbóż - zjawiska, w którym nasiona (ziarniaki) w wyniku przedwczesnego przełamania spoczynku, kiełkują w kłosie na roślinie macierzystej. Zjawisko to przynosi niebagatelne straty gospodarcze spowodowane obniżeniem plonów i pogorszeniem wartości technologicznej ziarna. Co gorsze, w związku z postępującym globalnym ociepleniem klimatu przewiduje się znaczne nasilenie tego problemu w kolejnych latach. Stawia to przed rolnictwem poważne wyzwanie polegające na konieczności uzyskania nowych odmian, zaadaptowanych do zmieniających się warunków klimatycznych.

Przedłożona do recenzji praca doktorska podejmuje próbę określenia molekularnych podstaw porostania zbóż, co jest jak najbardziej uzasadnione.

Zatem biorąc powyższe pod uwagę należy stwierdzić, że Autorka podjęła badania w ważnej dziedzinie nauki, zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia.

2. Uwagi formalne

Forma rozprawy doktorskiej mgr Justyny Fidler spełnia ogólnie przyjęte wymagania stawiane eksperymentalnym pracom doktorskim.

Dysertacja liczy 127 stron. Poza zasadniczą treścią zawiera: streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści, a także informację o źródłach finansowania eksperymentów.

Treść rozprawy została podzielona na rozdziały: przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury.

Autorka rozpoczyna rozprawę od „Przeglądu literatury”, w którym przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy, wprowadzając czytelnika w istotę problemu. Jest to, poza prezentacją materiału badawczego, przegląd aktualnej literatury dotyczącej spoczynku i kiełkowania nasion, a także zjawiska przedźniwnego porostania zbóż. Omówiła czynniki zewnętrzne i czynniki endogenne (hormonalne) warunkujące spoczynek i kiełkowanie nasion. Szczególnie obszerna jest część przeglądu poświęcona metabolizmowi kwasu abscysynowego oraz jego regulacji w ziarniakach zbóż podczas ich wykształcania, dojrzewania i kiełkowania. Rozdział „Przegląd literatury” jest napisany jasno i spójnie logicznie, jest także ilustrowany kilkoma przejrzystymi schematami. Większość cytowanych prac pochodzi z ostatnich lat i świadczy o dobrej znajomości literatury.

W rozdziale „Cel badań” krótko przedstawiono przyjętą do weryfikacji hipotezę zakładającą, iż jednym z czynników decydujących o głębokości spoczynku ziarniaków pszenżyta jest zróżnicowana zdolność ziarniaków do biosyntezy i katabolizmu kwasu abscysynowego.

Jak przedstawiła Autorka, pierwszym etapem podjętych badań było poznanie sekwencji nukleotydowych genów kodujących potencjalne enzymy regulatorowe szlaku biosyntezy i katabolizmu ABA u pszenżyta, czyli dioksygenazę 9-*cis*-epoksykarotenoidową (NCED) oraz 8'-hydroksylazę ABA (ABA8'OH). W drugim etapie pracy zbadano ekspresję tych genów podczas dojrzewania oraz kiełkowania ziarniaków pszenżyta dwóch odmian różniących się podatnością na przedźniwne porostanie (Leonardo i Fredro). W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę funkcjonalną wytypowanych u pszenżyta genów kodujących NCED oraz ABA8'OH, poprzez ich nadekspresję w tytoniu. Należy podkreślić, że postawione cele zostały zrealizowane, o czym świadczy analiza dalszych rozdziałów rozprawy doktorskiej.

Część „Materiały i metody” tradycyjnie zawiera dane na temat materiału roślinnego, warunków doświadczeń i przyjętego modelu badawczego oraz zastosowanych testów i metod, które w omawianym przypadku zostały właściwie dobrane i umożliwiły realizację postawionych zadań/problemów.

W pracy odnajdujemy opisy prostych doświadczeń fizjologicznych w celu określenia kiełkowania ziarniaków, a także rutynowej metody immunoenzymatycznej dla oznaczenia zawartości ABA w materiale roślinnym. Ponadto Doktorantka użyła szeregu skomplikowanych technik biologii molekularnej m. in. w celu identyfikacji i analizy sekwencji nukleotydowych wybranych genów biorących udział w metabolizmie ABA

(z opisu wyniku, że jedynie sekwencjonowanie DNA plazmidowego wykonano w profesjonalnej pracowni Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie). Dzięki zastosowaniu metody ilościowej opartej na RT-PCR określono poziom transkryptów genów kodujących enzymy metabolizmu ABA. W końcu, w celu przeprowadzenia analizy funkcjonalnej wybranych genów, przeprowadzono skomplikowaną heterologiczną ekspresję wytypowanych genów pszenżyta w tytoniu. Wszystkie żmudne i wieloetapowe metody Autorka opisała szczegółowo i wyczerpująco, zamieszczając dodatkowo 2 rysunki i 10 tabel. Większość analiz wykonywano w trakcie (i) dojrzewania ziarniaków (tj. po 25, 30, 35, 40, 45 i 50 dniach od zapylenia), (ii) po ustąpieniu spoczynku ziarniaków w wyniku 3-miesięcznego późniejszego przechowywania, a także (iii) w kilku interwałach czasowych podczas indukowanego przedźniwnego porostania ziarniaków pszenżyta. Badania przeprowadzono w 3 powtórzeniach, a uzyskane wyniki poddano podstawowej analizie statystycznej i przedstawiono w postaci wartości średnich \pm odchylenie standardowe (SD).

W rozdziale „Wyniki” zawarta jest dokumentacja przeprowadzonych doświadczeń w postaci: 32 rysunków (wśród których dwa to *de facto* dokumentacja fotograficzna materiału roślinnego), 1 tabeli oraz szczegółowego opisu uzyskanych wyników. Na uwagę zasługuje bardzo logiczny układ przeprowadzonych eksperymentów i adekwatny opis uzyskanych wyników.

W pierwszej kolejności przedstawiono badania, w wyniku których zidentyfikowano dwie pełnej długości sekwencje cDNA dioksygenazy 9-*cis*-epoksykarotenoidowej pszenżyta, *TsNCED1* i *TsNCED2*, enzymu szlaku biosyntezy kwasu abscysynowego oraz dwie pełnej długości sekwencje cDNA 8'-hydroksylazy ABA pszenżyta, *TsABA8'OH1* i *TsABA8'OH2*, enzymu szlaku katabolizmu ABA.

W dalszej części tego rozdziału przedstawiono obszerną dokumentację opisującą molekularne mechanizm formowania, utrzymywania i ustępowania spoczynku ziarniaków pszenżyta, a także m.in. przełamania spoczynku w wyniku indukcji przedwczesnego porostania u odmiany charakteryzującej się dużą podatnością na to zjawisko.

Wśród osiągnięć Autorki omawianej pracy na polkreslenie zasługuje m.in.:

- stwierdzenie, że mniejsza podatność ziarniaków pszenżyta na przedźniwne porostanie (odmiany Fredro) jest związana z większą zawartością ABA, co jest wynikiem intensywnej biosyntezy tego fitohormonu, o czym świadczy wysoka ekspresja genów kodujących kluczowe enzymy syntezy ABA (*TsNCED1* i *TsNCED2*), a efektem tych zdarzeń jest podtrzymanie spoczynku i ograniczone kiełkowanie ziarniakach;

- wykazanie, że podczas imbibicji ziarniaków pszenżyta podatnych na porastanie (odmiany Leontino) zebranych w okresie dojrzałości pełnej następuje wzmożony katabolizm ABA, który związany jest z wysokim poziomem transkryptu genów katabolizmu ABA - *TsABA8'OH1* i *TsABA8'OH2*, co skutkowało ustąpieniem spoczynku i kiełkowaniem ziarniaków odmiany Leontino;
- potwierdzenie, na podstawie wyników analizy funkcjonalnej, iż *TsNCEDI* odgrywa dominującą rolę w regulacji biosyntezy ABA, gdyż nasiona transgenicznych roślin tytoniu z nadekspresją tego genu charakteryzowały się wyższą zawartością ABA w porównaniu do nasion roślin typu dzikiego. Ponadto nasiona roślin transgenicznych kiełkowały później niż nasiona roślin typu dzikiego, co wskazuje na udział *TsNCEDI* w regulacji spoczynku.
- stwierdzenie, w oparciu o analizę profili ekspresji *TsABA8'OH1* i *TsABA8'OH2* w połączeniu z analizą funkcjonalną *TsABA8'OH2*, iż oba geny biorą udział w regulacji katabolizmu ABA w ziarniakach pszenżyta.

Osiągnięcia te nie tylko pogłębiają znajomość biologii badanej rośliny tj. pszenżyta, pozwalając na lepsze zrozumienie ustępowania spoczynku i kiełkowania ziarniaków tego gatunku, ale stanowią również istotny element prac nad poznaniem molekularnych mechanizmów zjawiska przedźniwnego porastania. Ponadto uzupełniają, przynajmniej częściowo, lukę w doniesieniach literaturowych dotyczących tego zagadnienia, bowiem w przeważającej mierze opublikowane dane dotyczą *Arabidopsis* - modelowej roślinie w badaniach molekularnych.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wskazują, że jednym z czynników warunkujących głębokość spoczynku ziarniaków różnych odmian pszenżyta jest ich zróżnicowana zdolność do biosyntezy i katabolizmu kwasu abscysynowego. Zatem zawartość ABA może być jednym z czynników determinujących podatność na przedźniwne porastanie. Wytypowanie kluczowych genów odpowiedzialnych za porastanie stwarza możliwość uzyskania nowych odpornych na to zjawisko odmian.

W rozdziale „**Dyskusja**” Doktorantka omawia otrzymane wyniki na tle badań innych autorów. Należy podkreślić, że dyskusja uwzględnia liczne aktualne prace, jak i opracowania starsze, które są niejednokrotnie podstawowe dla badań spoczynku nasion. Uważam, że ten rozdział jest dobrze napisany, dyskusja jest spójna i zajmująca, a podzielenie jej na podrozdziały ułatwia śledzenie toku rozumowania Autorki.

W podrozdziale „Podsumowanie i wnioski”, Autorka zawarła/wypunktowała swoje najistotniejsze obserwacje i spostrzeżenia.

Wyjątkowo obszerna „Literatura” to wykaz cytowanych publikacji, który obejmuje 155 pozycji głównie anglojęzycznych czasopism (szkoda, że nie ponumerowanych). Wykaz piśmiennictwa świadczy o tym, że Autorka doskonale orientuje się w zakresie problematyki badawczej będącej obiektem jej zainteresowań i potrafi dobrze je wykorzystać do interpretacji własnych wyników.

3. Uwagi szczegółowe

Recenzowana rozprawa zasługuje na pozytywną ocenę merytoryczną, napisana jest poprawnym językiem z bardzo dobrze przygotowaną dokumentacją. Jednakże Autorce nie udało się uniknąć pewnych błędów, niezręczności językowych i drobnych potknięć redakcyjnych, które zaznaczyłam w tekście dostarczonej pracy doktorskiej. Pragnę zaznaczyć, że nie umniejszają one wartości merytorycznej pracy. Z obowiązku recenzenta przytaczam poniżej przykład, a także przedstawiam inne aspekty pracy w celu zainicjowania dyskusji z Autorką:

1/ na str. 94 znajduje się mało zrozumiałe i niezręczne zdanie: cyt. „...nasiona z nadekspresją *TsABA8'OH2* wykształcały większy procent siewek o niezmienionej budowie (w porównaniu do siewek kielkujących w warunkach kontrolnych..”. Proszę o komentarz i stosowne wyjaśnienie tych niezręczności na tle definicji procesu kiełkowania nasion w ujęciu fizjologii roślin *versus* w ujęciu nauk rolniczych (czy ogrodniczych);

2/ w pracy określano wrażliwość kielkujących nasion na ABA. Proszę o krótką odpowiedź na pytanie: co decyduje o wrażliwości tkanki roślinnej na wybrany hormon roślinny?

3/ na str. 13 zamieszczono zdanie cyt „...kiełkowanie kończy się w momencie przebicia okrywy nasiennej przez wzrastający zarodek, u większości gatunków korzeń zarodkowy.” Proszę o rozszerzenie tej wypowiedzi i podanie kilku przykładów roślin, u których kiełkowanie kończy się przebicciem okrywy przez inną niż korzeń zarodkowy część zarodka.

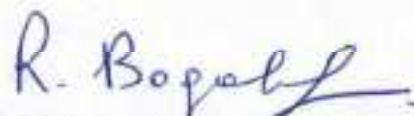
4. Wniosek końcowy

Przedstawioną do recenzji pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Uważam, że jest ona dobrym opracowaniem naukowym, ponadto wnosi nowe, istotne odkrycia pozwalające lepiej

poznać skomplikowany kompleks regulatorowy spoczynku nasion/ziarniaków oraz molekularny mechanizm przedźniwnego porostania zbóż.

Część eksperymentalna pracy została prawidłowo zaplanowana i wykonana. Godna uznania jest duża liczba i różnorodność przeprowadzonych testów i analiz, a szczególnie zastosowanie bogatego warsztatu metodycznego z zakresu technik biologii molekularnej podczas realizacji zadań badawczych. Postawione przez Doktorantkę cele zostały w pełni zrealizowane.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa pt. "**Udział genów kodujących wybrane enzymy metabolizmu kwasu abscysynowego w regulacji spoczynku ziarniaków pszenżyta (*x Triticosecale* Wittm.)**" spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Ustawą o tytułach i stopniach naukowych. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW w Warszawie o dopuszczenie jej Autorki - **mgr Justyny Fidler** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto wnioskuję do Rady Wydziału o wyróżnienie tej pracy.



Prof. dr hab. Renata Bogatek-Leszczyńska