

Dr hab. inż. Iwona Żur, prof. nadzw. IFR PAN  
Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego*  
Polska Akademia Nauk  
Niezapominajek 21,  
30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Śniegowskiej-Świerk  
pt. „**Wybrane aspekty regulacji ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* w odpowiedzi na stres suszy u  
jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.)**”  
wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego,  
Uniwersytetu Rolniczego im. *Hugona Kołłątaja* w Krakowie

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) jest gatunkiem zboża o wysokim potencjale plonotwórczym, a jego ziarno ma dużą wartość użytkową i paszową. Potencjalnie wysoka wydajność tego zboża może być jednak znacząco obniżana przez niską tolerancję na suszę glebową. O ile jęczmień ozimy ze względu na silny system korzeniowy rozwijany jesienią i lepsze wykorzystanie wody z opadów zimowych, dobrze znosi suszę wiosenną, jęczmień jary stanowiący przedmiot badań niniejszej rozprawy jest wyjątkowo narażony na negatywne efekty niedoboru wody zarówno w fazie krzewienia jak i kłoszenia.

W Polsce, susza glebowa stanowi istotny problem, głównie z uwagi na periodyczny charakter tego zjawiska przejawiający się serią lat mokrych przerywaną kilkuletnim okresem deficytu opadów atmosferycznych. Największym deficytem wody charakteryzuje się region środkowej Polski, obejmujący województwa Lubuskie, Wielkopolskie i Mazowieckie, a więc obszar intensywnie użytkowany rolniczo. W przypadku zbóż, straty plonu spowodowane działaniem suszy glebowej mogą wynosić nawet do 70%. Ponieważ trudno jest dostosować strukturę uprawy zbóż do tak dynamicznie zmieniającego się i nieprzewidywalnego czynnika klimatycznego jakim są opady atmosferyczne, bardzo istotna jest identyfikacja czynników determinujących odporność na suszę i opracowanie wiarygodnych procedur selekcji roślin o zwiększonej tolerancji na ten czynnik stresowy. O istotności tego problemu świadczy fakt, iż badania dotyczące odporności na stresy abiotyczne, w tym suszę u jęczmienia, należą do tematów priorytetowych na najbliższe lata. Badania tego typu są prowadzone m.in. w ramach konsorcjum POLAPGEN i projektu POLAPGEN-BD finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego, Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, którego część stanowią wyniki prezentowane w niniejszej pracy.

Rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Fizjologii Roślin, Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Rapacza oraz dr inż. Barbary Jurczyk. Badania realizowano w ramach projektu PRELUDIUM (DEC-2012/07/N/NZ9/02412) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz wyżej wspomnianego projektu POLAPGEN-BD (UDA-POIG.01.03.01-00-101).

W pracy doktorskiej wyróżnić można dwa kierunki badawcze: - badania prowadzone na poziomie molekularnym mające na celu określenie zmian ekspresji wybranych genów związanych z odpowiedzią na suszę i identyfikację regionów genomu regulujących te zmiany oraz – badania na poziomie komórkowym, których celem było określenie roli cytoszkieletu aktynowego w transdukcji sygnału indukowanego niedoborem wody.

Rozprawa liczy 80 stron i posiada klasyczny układ obejmujący Streszczenie, Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Spis literatury. Do tekstu dołączono 9 tabel i 20 rycin, dokumentujących uzyskane wyniki. Układ pracy jest poprawny pod względem formalno-metodycznym, drobnym mankamentem jest brak wykazu stosowanych skrótów, który stanowiłby przydatne uzupełnienie ułatwiające odbiór pracy.

We Wstępie Doktorantka przedstawiła charakterystykę botaniczną i systematyczną oraz dane dokumentujące rozmieszczenie uprawy jęczmienia zwyczajnego, znaczenie i wykorzystywanie tego gatunku. W tej części pracy moje zastrzeżenie budzi tylko podana wysokość średniego plonowania (2,5 t/ha), która najprawdopodobniej wynika z dużego zróżnicowania warunków uprawy w skali całego świata. Dla polskich warunków wartość ta jest sporo niższa (wg. COBORU w roku 2015 plon wzorca dla jęczmienia jarego wyniósł 6,5 t/ha).

Następnie Doktorantka opisała znaczenie prawidłowych stosunków wodnych w roślinie, wpływ niedoboru wody na procesy komórkowe i fizjologię roślin oraz fizjologiczne i molekularne mechanizmy odpowiedzi na stres suszy. Bardziej szczegółowo opisano funkcję genów wyselekcjonowanych do badań (*HVA1*, *Srg6*, *ADF*) oraz rolę cytoszkieletu aktynowego i jego potencjalny udział w transdukcji sygnałów. W mojej opinii warto byłoby uzupełnić ten opis o choćby wzmiankę dotyczącą cytoszkieletu mikrotubularnego, gdyż oba typy filamentów pozostają ze sobą w ścisłej współpracy. Dlatego też chciałabym prosić Doktorantkę o krótkie uzupełnienie informacji na temat funkcji cytoszkieletu mikrotubularnego, wzajemnych oddziaływań pomiędzy filamentami aktynowymi i mikrotubulami oraz o wyrażenie opinii na temat potencjalnego udziału cytoszkieletu mikrotubularnego w reakcji na stres suszy.

Ostatnią część Wstępu Doktorantka poświęciła na szczegółowy opis metody eQTL (ang. *expression Quantitative Trait Loci*) wykorzystanej w pracy do identyfikacji regionów genomu regulujących poziom ekspresji analizowanych genów.

Cel pracy i zadania badawcze sformułowano jasno i przejrzysto. W obliczu wyzwań przed jakimi staje współczesne rolnictwo i mając na uwadze istotny problem, jaki w zmieniających się warunkach klimatycznych stanowi susza, uważam że podjęcie badań mających na celu identyfikację mechanizmu tolerancji na ten stres należy uznać za uzasadnione.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorantka przedstawiła pochodzenie i warunki wzrostu materiału roślinnego, układ doświadczeń oraz metody i techniki analityczne wykorzystane w pracy. Opis metodyki jest jasny, co ze strony Doktorantki świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym. W opisie wykorzystywanej do badań populacji mapującej zabrakło informacji (ważnej zwłaszcza dla hodowców), która z odmian rodzicielskich stanowiła formę mateczną, a która ojcowską. Informację tę uzyskujemy pośrednio dopiero z opisu wyników analizy eQTL (str. 46). Brakuje również informacji dotyczących opracowanej mapy genetycznej (np. danych dotyczących gęstości czy ilości i rozmieszczenia markerów molekularnych).

W pierwszych rozdziałach opisujących uzyskane wyniki, Doktorantka przedstawiła dane uzyskane z analizy ekspresji genów *HVA1* i *Srg6*, wyniki mapowania eQTL oraz analizy bioinformatycznej. Przeprowadzona analiza statystyczna pozwoliła na identyfikację trzech eQTL-i warunkujących ekspresję genu *HVA1*, wśród których dla jednego z kodowanych białek znaleziono adnotacje funkcjonalne. Podobnie, jak ma to miejsce w przypadku pojedynczego eQTL zidentyfikowanego dla genu *Srg6*, funkcje zidentyfikowanych produktów związane są ze szlakiem degradacji białek zależnym od ubiquityny. Wyniki te stanowią cenne potwierdzenie i uzupełnienie informacji dotyczących molekularnej regulacji adaptacji do warunków suszy glebowej.

Pomiary zmiany ekspresji genów poprzedzono analizą stosunków wodnych w liściach roślin poddanych działaniu suszy. Pomiary te wykonano jednak tylko dla roślin form

rodzicielskich, podczas gdy interesujące byłyby również dane obrazujące zakres zmienności i rozkład tej cechy w obrębie całej populacji mapującej.

Opis wyników drugiej części badań rozpoczęto od informacji, które stanowią uzupełnienie części metodycznej. Ciekawym dla mnie, jest traktowanie stresem suszy poprzez suszenie fragmentów liści w temperaturze 35°C, i proszę Doktorantkę o wyjaśnienie takiego, odmiennego od zastosowanego w pierwszej części badań, podejścia metodycznego.

Następnie Doktorantka przedstawiła wyniki pomiaru względnej zawartości wody w liściach poddawanych suszeniu (Tabela 6). Wyniki te stanowią cenne uzupełnienie, jednak załączony jako element analizy statystycznej przedział ufności nie pozwala na porównanie tempa utraty wody pomiędzy badanymi odmianami.

Szczegółowo opisano wyniki dotyczące organizacji cytoszkieletu aktynowego, jednak pewne zastrzeżenia budzi niezbyt starannie dobrana i dopracowana dokumentacja fotograficzna (Ryc. 12-19).

Opisując wyniki pomiaru względnej intensywności fluorescencji wyznakowanych filamentów aktynowych (Tabela 7) Doktorantka stwierdziła, iż była ona znacznie wyższa w liściach odmiany CAM/B1/C1 co nie jest do końca zgodne z prawdą, gdyż dotyczy filamentów korykalnych oraz zlokalizowanych w komórkach miękiszu, i to jedynie w warunkach kontrolnych.

Bardzo interesujące dane uzyskano analizując zmiany akumulacji aktyny i ekspresji wybranych genów (*AKT11*, *ADF1*, *ADF3*, *Sgr6*, *HVA1*) pod wpływem stresu suszy i traktowania inhibitorem polimeryzacji aktyny (latrunkuliną-B). Wyniki te pozwoliły na sformułowanie wniosków o charakterze nowatorskim.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka odniosła się do uzyskanych wyników w oparciu o najnowsze doniesienia literatury światowej. W większości przypadków interpretacja wyników jest prawidłowa, jednak w poniżej wymienionych przypadkach zamieszczone sugestie są nieuzasadnione lub budzą wątpliwości.

Na str. 64 Doktorantka twierdzi iż: „Susza I fazy była aplikowana od fazy siewki i jej działanie odbijało się w fazie krzewienia, susza II fazy aplikowana w fazie liścia flagowego dawała rezultat w fazie kłoszenia.” Jak rozumiem jest to jedynie logiczne założenie, gdyż w pracy nie zamieszczono żadnych eksperymentalnych danych, potwierdzających wpływ zastosowanego traktowania stresem suszy na dalszy rozwój roślin, komponenty składowe i wysokość plonu. Takie dane byłyby cennym uzupełnieniem uzyskanych wyników i na przyszłość sugeruję przeprowadzenie tego typu pomiarów.

Na str. 68 Doktorantka sugeruje, iż odmiana CAM/B1/C1 charakteryzuje się niższym deficytem wody w liściach roślin rosnących w warunkach suszy, jednak hipotezy tej raczej nie potwierdzają wyniki przeprowadzonej analizy stosunków wodnych zamieszczone w Tabeli 4. Wiarygodnych dowodów dostarczyłoby przeprowadzenie pomiarów potencjału wody lub potencjału osmotycznego liści.

Na str. 69 Doktorantka zasadniczo zmienia zdanie, co do wyników analizy względnej fluorescencji i skorelowaną z tym parametrem z ilością filamentów aktynowych u badanych odmian. Jest to ewidentna pomyłka, która na szczęście nie wpłynęła zasadniczo na dalszy tok wnioskowania.

Zawarte w osobnym rozdziale wnioski są w większości dobrze udokumentowane. Wyjątek stanowi stylistycznie nieprawidłowo sformułowany wniosek nr 4. W przypadku odmiany wrażliwej poziom akumulacji białka aktyny w liściach roślin rosnących w warunkach suszy jest niższy w porównaniu do odmiany odpornej, wyraźnie wyższa jest natomiast relatywna zmiana poziomu akumulacji aktyny pod wpływem stresu. Nieco przedwczesny wydaje się również

wniosek nr 7, który nie ma żadnego związku z prowadzonymi w ramach pracy badaniami i jest wynikiem rozważań o czysto hipotetycznym charakterze.

Spis Literatury zawiera 109 cytowanych pozycji, w większości z ostatniego dziesięciolecia, co potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki. W spisie brak dwóch pozycji literaturowych: Bryan i in. 1999 (str. 35), Remy i in. 2013 (str. 67).

Praca napisana jest poprawną polszczyzną, w sposób jasny i klarowny, drobne błędy stylistyczne i edytorskie zaznaczono bezpośrednio w tekście.

Ważniejsze uwagi edytorskie:

Przedstawiony na str. 28 wzór na obliczanie parametru RWC zawiera błąd.

W Tabeli 5 (str. 44) brak informacji o poziomie istotności współczynników korelacji, ponadto bardziej przejrzyste byłoby zamieszczenie tylko wartości statystycznie istotnych lub wyróżnienie ich np. typem czcionki.

Ryc. 12-19. Błąd w numeracji rycin, na kilku rycinach (17-19) brakuje oznaczeń komórek miększu (M) i epidermy (Ep). Generalnie percepcją ułatwiłoby zorientowanie wszystkich zdjęć w tym samym układzie przestrzennym.

Układ Tabeli 9 (str. 62) jest niepotrzebnie skomplikowany, dane zawarte w kolumnie 3 i 4 duplikują dane prezentowane na Ryc. 20a-e i mogłyby zostać pominięte.

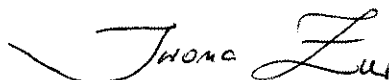
Wymienione powyżej zastrzeżenia i uwagi nie obniżają wartości merytorycznej pracy. Podsumowując całokształt rozprawy, wysoko oceniam założenia i wybór celu pracy, sposób weryfikacji hipotezy badawczej oraz dobór molekularnych, cytologicznych i statystycznych metod analitycznych.

Na szczególne uznanie zasługują:

- potwierdzenie udziału genów *HVA1* i *Srg6* w odpowiedzi roślin na stres suszy u jęczmienia jarego przy równoczesnym wykazaniu odmiennej funkcji tych genów,
- lokalizacja QTL-i regulujących ekspresję wyżej wymienionych genów i określenie prawdopodobnej funkcji dla części z kodowanych w tych rejonach białek jako związanej z procesem ubikwitynacji,
- wykazanie udziału cytoszkieletu aktynowego w regulacji ekspresji genu *HVA1* i transdukcji sygnału deficytu wody w komórce roślinnej i przedstawienie hipotetycznego scenariusza odbioru bodźca suszy.

Z praktycznego punktu widzenia dla hodowli twórczej, bardzo przydatna może okazać się identyfikacja markerów sprzężonych z odpowiedzią na stres suszy.

Oceniając całokształt rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Śniegowskiej-Świerk pt. „Wybrane aspekty regulacji ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* w odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.)” stwierdzam, że przedłożona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego im. *Hugona Kołłątaja* w Krakowie o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wartość merytoryczną pracy wnioskuję również o jej wyróżnienie.



Kraków, 15.09.2016

dr hab. inż. Iwona Żur, prof. nadzw. IFR PAN