

Dr hab. inż. Paweł Milczarski
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Szczecin, 20.09.2016 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Śniegowskiej-Świerk
p.t.: „Wybrane aspekty regulacji ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* w odpowiedzi na stres suszy
u jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.)”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 80 stron, łącznie ze stroną tytułową oraz spisem literatury i jest podzielona na 7 rozdziałów. Dokumentację stanowi 20 rycin i 9 tabel. Na spis literatury składa się 109 pozycji, nie wszystkie jednak są cytowane w pracy, lub cytowane są nieprawidłowo, ale o tym w dalszej części. Co do struktury pracy nie mam zasadniczych zastrzeżeń. Wydaje się, że zamieszczenie, zaraz po spisie treści, streszczeń w języku polskim i angielskim jest słusznym zabiegiem, szczególnie w przypadku gdy wstęp do pracy jest równocześnie przeglądem literatury. Najczęściej w dysertacjach streszczenia umieszcza się na końcu jako jej podsumowanie, lecz w tym przypadku czytelnik otrzymuje od razu kwintesencję pracy i wie czego może się spodziewać.

Pierwszy rozdział rozprawy to liczący 16 stron wstęp. Stanowi on wprowadzenie do tematu pracy i rozpoczyna się od krótkiej charakterystyki jęczmienia zwyczajnego jako gatunku, następnie przechodzi do charakterystyki badanego zjawiska tzn. stresu suszy, mechanizmów odpowiedzi roślin na ten stres, a w dalszej kolejności do charakterystyki badanych w pracy genów. Wydzielono w nim również podrozdział opisujący rolę cytoszkieletu aktywnego w komórce, oraz kolejny dotyczący identyfikacji eQTL.

Charakterystyka jęczmienia zwyczajnego została wykonana nader pobieżnie. Uważam, że dodatkowy krótki podrozdział zawierający podstawowe dane cytogenetyczne i genomiczne jęczmienia byłby wskazany. Nie wydłużyłby nadmiernie pracy, a czytelnikowi interesującemu się zjawiskiem suszy u innych gatunków pomógł zrozumieć przyczynę, dla której badania złożonych cech ilościowych u jęczmienia są tak długotrwałe i skomplikowane. Podrozdział opisujący stres suszy uważam za dobrze przygotowany. Jednak znajduje się tam szereg nieprecyzyjnych lub niezrozumiałych sformułowań. Chociażby stwierdzenie umieszczone na początku podrozdziału (str. 10), że współczesna wiedza na temat gospodarki wodnej: „wydaje się być”, znacznie większa niż za czasów Arystotelesa. W kolejnych częściach wstępu Autorka dokonuje charakterystyki genów badanych w pracy (*HVA1*, *Srg6* i rodziny *ADF*) oraz opisuje rolę cytoszkieletu aktywnego w komórce. Kolejny podrozdział, przy którym chciałbym zatrzymać się na chwilę dotyczy mapowanie eQTL. Znalazłem w nim drobne nieścisłości w nomenklaturze, jak chociażby tłumaczenie angielskiego skrótu QTL: „Quantitative Trait Locus” jako „loci cech ilościowych”, podczas gdy prawidłowo powinno być „loci cechy ilościowej”. Tu

ważna uwaga, słowa pochodzące z języka łacińskiego, jak np. *loci*, piszemy kursywą. Dodatkowo chciałbym zauważyć, że Autorka nie wyjaśniła znaczenia skrótu „eQTL”. Prawidłowa identyfikacja QTL, w tym eQTL, wymaga spełnienia szeregu kryteriów. Najważniejszymi z nich są precyzyjne oznaczenie badanej cechy uwzględniające odpowiednią liczbę powtórzeń i dokładność metody pomiaru, typ i liczebność ocenianej populacji oraz liczbę markerów i gęstość mapy genetycznej. Zgadzam się z Autorką, że jednym z ważniejszych elementów wpływających na dokładność mapowania eQTL jest wybór populacji mapującej. Wśród możliwych do wykorzystania typów populacji można wymienić: RIL (rekombinacyjne linie wsobne) (niektórzy badacze używają nazwy SSD), DH (podwojone haploidy), NIL (linie bliskoizogeniczne), BC (mieszance wsteczne), BIL (linie wsobne wyprowadzone z BC), IL (linie introgresywne) oraz F₂. Przyznaję jednak, że nie znam takiego typu populacji mapującej jak: „rekombinowane szczepy wsobne” (str. 23). Dodatkowo pragnę zauważyć, że nie jest poprawnym zwrot „metody eQTL”. Ekspresyjne QTL to regiony chromosomowe, w których stwierdzamy związek zmienności cechy, np. liczby kopii danego genu, i segregacji markerów mapy genetycznej. Prawidłowe zatem są stwierdzenia: „identyfikacja eQTL”, „wykrywanie eQTL”, „mapowanie eQTL”.

W omawianym rozdziale Doktorantka wykorzystowała 68 pozycji literaturowych. W cytowaniach prac wkraady się jednak błędy. Na stronie 10 wykazano pracę Motzo z 2001 roku podczas gdy takiej pracy nie ma w spisie literatury, ale jest praca Motzo i in. (2001). Podobnie zauważono na str. 11 i 13 prace: Rizza (2004) i Nguyen (1997), które prawdopodobnie powinny mieć dopisek: „i in.”, tak jak w bibliografii. A z drobnych uwag cytowana na str. 18 praca Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki (2007) ma angielski spójnik „and”.

W rozdziale drugim Autorka przedstawiła główny cel pracy, którym było powiększenie wiedzy o mechanizmach regulujących ekspresję dwóch wybranych genów tolerancji suszy tj., *HVA1* i *Srg6*. Poza nim wytyczyła sobie również dwa cele szczegółowe: poszukiwanie sekwencji DNA związanych z regulacją ekspresji badanych genów w trakcie suszy działającej w różnych fazach rozwojowych jęczmienia oraz weryfikację hipotezy, że rearanżacja cytoszkieletu aktywnego, jest elementem mechanizmu odpowiedzi na suszę w komórkach liści jęczmienia i prowadzi do uruchomienia ekspresji genu *HVA1*.

W rozdziale trzecim Doktorantka charakteryzuje materiał roślinny, układ i warunki prowadzonego doświadczenia, metodykę określania profili ekspresji genów, zawartości aktywności, obserwacji mikroskopowych oraz mapowania eQTL i innych analiz statystycznych. Wybór materiału badawczego Autorka miała ułatwiony, bo został on przetestowany wcześniej w badaniach pilotażowych. Opis doświadczenia, w którym zastosowano stres suszy jest jednak niepełny. Brakuje informacji w jakim okresie prowadzono doświadczenie(a) (rok/lata), w ilu powtórzeniach wykonano doświadczenie, ile roślin znajdowało się w jednej doniczce (wazonie)? W dalszej części tego rozdziału opisana została metodyka analizy ekspresji genów z użyciem komercyjnych zestawów i udokumentowanych modyfikacji. Następnie zaprezentowano protokoły przygotowania preparatów, sposób prowadzenia i analizy obserwacji mikroskopowych. Zauważyłem, że często w tekście, w tym również w tytule podrozdziału 3.6 (str. 33), używany jest zwrot „białka aktywności”. Prosiłbym Doktorantkę o

wyjaśnienie. W końcowej części rozdziału Autorka opisuje mapowanie eQTL i inne analizy statystyczne. W opisie mapowania pojawia się, poza wymienianą wcześniej i użytą w badaniach populacją Maresi × Cam/B1/C1, populacja Georgia × Harmal, której przeznaczenie nie jest znane, poza tym, że posłużyła do utworzenia mapy zintegrowanej. Zabrakło tu również krótkiego opisu stanu mapy genetycznej: liczby i rodzaju markerów oraz gęstości mapy. Nie znalazłem również informacji o tym czy strukturalne geny *HVA1* i *Srg6* zostały umieszczone na mapie genetycznej. Miałbym dodatkową sugestię dla Doktorantki, aby przed opublikowaniem wyników dotyczących identyfikacji eQTL przetestować inny program np. WinQTLCartographer czy MapQTL, oraz uzupełnić metodykę o test zgodności rozkładu cechy z rozkładem normalnym. W przypadku stosowania testów parametrycznych do identyfikacji QTL, tak jak ma to miejsce w niniejszej pracy, cecha powinna mieć rozkład zbliżony do normalnego. W przeciwnym wypadku należy zastosować test nieparametryczny np. Kruskala-Wallisa. W rozdziale tym wykorzystano 12 prac innych autorów, przy czym publikacji Bryan i in. (1999) nie znalazłem w spisie literatury. Przedstawione w rozdziale metody opisane są zasadniczo klarownie i poza przedstawionymi wyżej drobnymi uwagami, uznaję za wyczerpujące.

Najważniejszą część dysertacji stanowi rozdział czwarty, omawiający wyniki uzyskane w pracy. W pierwszej części opisu wyników zaprezentowano pomiar ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* w dwóch fazach wegetacyjnych oraz identyfikację eQTL dla oznaczonych uprzednio e-cech. Pomiar względnej liczby kopii genu aktywowanego pod wpływem suszy był poprzedzony każdorazowo oceną względnej zawartości wody w liściu (RWC). Liczba kopii genu *HVA1* była zdecydowanie wyższa w odmianie Maresi niż w rodzie Cam/B1/C1 w obu badanych fazach rozwojowych roślin. Wśród osobników populacji mapującej stwierdzono bardzo duży zakres zmienności, od linii, u których transkryptu nie wykrywano (linie nr 18, 41, 47 w fazie siewki i linie nr 2, 23, 24, 36, 52 w fazie liścia flagowego) do takich, w których akumulacja transkryptu przekraczała poziom referencyjnego rodzica kilkadziesiąt razy i więcej (np. linia 70 w obu fazach rozwojowych). Inaczej przedstawiała się sytuacja w przypadku oznaczeń poziomu ekspresji genu *Srg6*. Tu w fazie siewki stwierdzano większą akumulację transkryptu w rodzie Cam/B1/C1 niż w odmianie Maresi, lecz w liściu flagowym różnic już nie stwierdzano. Różnicowanie liczby kopii genu *Srg6* w populacji mapującej w obu fazach rozwojowych było widoczne. Domyślam się, że brak odczytów w genotypie nr 9 wynika z faktu, że jest to linia usunięta z początkowej puli 100 linii populacji mapującej. Skoro tak, to należało jej nie uwzględniać w wynikach (ryciny 4-7). Oznaczono również współczynniki korelacji między poziomami ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* mierzonymi w obu fazach rozwojowych. To, że żaden ze współczynników korelacji nie ma znaczenia praktycznego nie oznacza, że nie należy wskazać, które z nich są istotne statystycznie (tab. 5).

W dalszej części pracy Autorka prezentuje wyniki mapowania eQTL. Badanymi e-cechami były ekspresja genów *HVA1* i *Srg6* oznaczone w dwóch fazach rozwojowych roślin rosnących w warunkach suszy. Identyfikację eQTL, można przeprowadzić na dwa sposoby. Pierwszym z nich jest wykorzystanie populacji mapującej, na osobnikach której oznaczono cechę, a następnie korzystając z narzędzi bioinformatycznych wykonano klasyczną analizę sprzężeniową. Drugim sposobem jest użycie zestawu niespokrewnionych genotypów (np.

odmian, rodów czy linii wsobnych), genotypowanie ich przy pomocy wybranych technologii markerowych, a w dalszej kolejności przeprowadzenie mapowania asocjacyjnego. Z metodyki nie wynika właściwie, czy wybrany został ten pierwszy sposób, choć na taki wybór wskazuje użycie populacji biparentalnej. Moje zastanowienie budzi jednak wykorzystanie modułu GWAS w programie Genstat, który jest stosowany w analizach mapowania asocjacyjnego. Na początku chciałbym zauważyć, że mapowanie eQTL metodą sprzężeniową winno być poprzedzone weryfikacją rozkładu cechy, tu e-cechy, której w pracy nie znalazłem. Jak Doktorantka zauważyła we wstępie, eQTL to region chromosomu, w którym stwierdza się związek markerów z cechą. Niezrozumiałe jest zatem dlaczego opisując wyniki mapowania eQTL nie określa regionu chromosomowego ani pozycji pików eQTL, a jedynie pozycje markerów, którym przypisuje miano eQTL. Spodziewałem się raczej wyników opisanych jak np. w pracy: Wang, J., Yu, H., Xie, W., Xing, Y., Yu, S., Xu, C., Li, X., Xiao, J. and Zhang, Q. (2010), A global analysis of QTLs for expression variations in rice shoots at the early seedling stage. *The Plant Journal*, 63: 1063–1074. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04303.x. Autorka przyjęła jednak inną strategię. Wszystkie sekwencje SNP mapy genetycznej najpierw mapowano z sekwencjami zgromadzonymi w bazach, po czym anotowano, a następnie w regionach eQTL (nie wiadomo jednak o jakich regionach mowa, albowiem nie zostały zaznaczone) wytypowano najbliższe sprzężone markery, niektóre z opisaną funkcją. Takie podejście przypomina bardziej analizę GWAM (ang. *Genome-Wide Association Mapping*) niż klasyczną analizę sprzężeniową. Prawdopodobnie otrzymano by zbliżone wyniki, gdyby do mapowania eQTL zastosować test nieparametryczny. Ponieważ tego nie zrobiono to zasadne pozostaje pytanie jaką właściwie metodę użyto do identyfikacji eQTL dla ekspresji badanych genów oznaczonej w osobnikach populacji mapującej mieszańca Maresi × Cam/B1/C1? Niestety w tekście zamiennie stosowane są pojęcia: „eQTL” i „marker” dla *HVHVA1*, *C2P41*, *C3P23* i *5880-2547*, co wprowadza chaos i niepotrzebne gmatwa i tak skomplikowany opis. Stwierdzenia, często powtarzane w tej części pracy, że np.: „eQTL oznaczony na mapie jako np. C3P23 czyli marker Bmag0692...”, nie są poprawne. Proponowałbym raczej wprowadzić inny system kodowania dla eQTL i zamiast *HVHVA1*, *C2P41*, *C3P23* i *5880-2547* wprowadzić nowe nazwy eQTL ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* np.: *e_HVA1_1*, *e_HVA1_2*, *e_HVA1_3* i *e_Srg6_1*. Wtedy markery zlokalizowane na mapie w regionie eQTL odpowiednio: *HVHVA1*, 4057-2114, Bmag0692 i 5880-2547, byłyby, co podkreślam, prawdopodobnymi markerami sprzężonymi z eQTL. Używam wyrażenia prawdopodobnie, dlatego że gdyby Doktorantka dysponowała precyzyjniejszą mapą o wielokrotnie większej gęstości, ze średnią odległością pomiędzy markerami wynoszącą np. 0,1 cM, to wynik identycznie przeprowadzonej analizy mógłby wykazać inną pulę markerów. Anotacja sekwencji tych markerów i wykazanie, że jest to fragment genu o znanej funkcji nie uprawnia jednak to kategorię twierdzeń o związku tych genów z regulacją badanej cechy. Nadal pozostaje to w kręgu prawdopodobieństwa. Autorka wspomina w opisie wyników o ustalonej pozycji chromosomowej genu *HVA1*, ale nie umieszcza go na mapie genetycznej. Brak jest też danych o lokalizacji genu *Srg6*. Nie pozwala to na precyzyjne określenie czy mamy do czynienia z eQTL w fazie *cis* czy *trans*.

Charakterystyka wykrytych eQTL, obejmuje procentową wartość obserwowanej zmienności cechy pozostającą pod jego kontrolą. Wartości te są różne, zależne od fazy rozwojowej i mieszczą się w zakresie od 4,8%, w przypadku *HVHVA1* do 40% stwierdzanych dla *C3P23*. Oznaczono także efekty zidentyfikowanych eQTL. I tu kolejne niefortunne sformułowania, z których wynika, że efekt eQTL był oznaczony dla markera! Pomijam fakt, że brak jest wyjaśnienia jaką miarą jest ten efekt (np. 1,88 dla *C3P23*, str. 46). Podsumowując tę część pracy, chciałbym zaznaczyć, że choć brakuje w niej usystematyzowania i stosowania właściwego nazewnictwa to po odpowiednim przereklamowaniu uzyskane wyniki będzie można z powodzeniem opublikować w czasopiśmie z IF.

W dalszej części rozdziału zaprezentowano wyniki badań nad zmianami organizacji filamentów aktynowych w tkankach niepoddanych i poddanych działaniu suszy. Zastosowany stres wpływał na reorganizację włókien aktynowych w tkankach, w porównaniu do poziomu optymalnego uwodnienia. Cienkie włókna aktynowe odmiany Maresi, obserwowane w komórkach mięksizu roślin niepoddanych stresowi suszy zniknęły, a pojawiły się grubsze włókna tworzące gęstą sieć. W komórkach epidermy włókna są nieliczne bez określonej konfiguracji. W komórkach mięksiszowych rodu *Cam/B1/C1* obserwowano liczne i pofragmentowane pierścienie, a w komórkach epidermy liczne i grube włókna aktynowe ułożone podłużnie. Zróżnicowana akumulacja aktyny w roślinach poddanych działaniu suszy i rosnących w warunkach optymalnego uwodnienia była związana z badanym genotypem. W warunkach suszy, w tkankach rodu *Cam/B1/C1*, stwierdzono prawie 3. krotnie, a w tkankach odmiany Maresi prawie 40. krotnie więcej aktyny niż w uznanej za kontrolę odmianie Maresi rosnącej w warunkach optymalnego uwodnienia. Gdy na te wyniki nałożymy oznaczenia poziomu ekspresji genu *AKT11* (gen ten koduje aktynę), który ulega niewielkiej zmianie w trakcie trwania suszy w rodzie *Cam/B1/C1* a wzrasta w odmianie Maresi, otrzymamy interesujący obraz. *Cam/B1/C1* jako forma lepiej przystosowana do warunków suszy cechuje się większą akumulacją filamentów aktynowych w warunkach normalnego uwodnienia, które prawdopodobnie nie muszą się tak intensywnie reorganizować w warunkach spadku turgoru jak wrażliwa odmiana Maresi. Całość uzupełniają oznaczenia akumulacji transkryptu genów *ADF1*, *ADF3*, *Srg6* i *HVA1* badanych w tkankach odmiany Maresi i rodu *Cam/B1/C1* wykonane w 5 punktach czasowych trwania suszy. Na uwagę zasługuje zróżnicowanie ekspresji genu *HVA1* w odmianie wrażliwej Maresi, u której wraz z wydłużaniem czasu trwania suszy nastąpił kilkusetkrotny wzrost akumulacji transkryptu, podczas gdy w rodzie odpornym ten wzrost był tylko kilkudziesięciokrotny. Niezwykle ważnych informacji dostarczył eksperyment z zastosowaniem latrunkuliny-B w tkankach liści poddanych suszy, w których mierzono poziom wspomnianych wyżej genów. Lat-B całkowicie zahamowała ekspresję genu *HVA1*, a nie wpływała znacząco na pozostałe geny. Potwierdza to związek ekspresji genu *HVA1* ze zmianami w układzie włókien aktynowych zachodzącymi w trakcie suszy, sugerując, że do wywołania ekspresji tego genu konieczna jest rearanżacja cytoszkieletu aktynowego.

Inne uwagi do tego rozdziału:

- w tabeli 4 użyto zwrotu „grupy jednorodności”, winno być „grupy jednorodne”,
- brak opisu osi Y na ryc. 4-7,

- w opisie ryciny 11 nieprawidłowy podpis; jest „ilustracja efektów eQTL sprzężonych z trzema markerami dla poziomu ekspresji genu *Srg6*”, podczas gdy chodzi o jeden: 5880-2547.

- zgodnie z charakterystyką materiału badawczego podanego w rozdziale „Materiał i Metody” Cam/B1/C1 jest rodem, a w opisie rozdziału „Wyniki” odmianą.

- należy też ujednoclić pisownię nazwy syryjskiego rodu (odmiany?). W rozdziale „Materiał i Metody” pierwszy człon pisany jest małą literą, a w rozdziałach „Wyniki” oraz „Dyskusja” dużą.

W rozdziale 5 zaprezentowano dyskusję wyników. Konfrontacja wyników własnych z rezultatami innych autorów została oparta o 40 pozycji literaturowych z tym, że pracy Stone (2014) nie ma w spisie literatury, jest za to praca Stone i in. (2014). Rozdział ten nie budzi moich większych zastrzeżeń, za wyjątkiem rozważań o eQTL. Dobrze, że w opisie zidentyfikowanych eQTL, Doktorantka jest już ostrożniejsza i uznaje że otrzymane eQTL są prawdopodobne. Niezrozumiałe jest dla mnie jednak, jak z jedynie prawdopodobnego wskazania ubikwityny E1.3 jako markera eQTL - 5880-2547, Autorka we wniosku nr 7 wywodzi, że: „... eQTL warunkujące zmianę ekspresji genów *HVA1* i *Srg6* pośrednio wskazują na powiązanie ścieżki sygnałowej dla suszy z hormonami (kwas jasmonowy, auksyny)”. Z tego wniosku zrezygnowałbym. Propozycje takiego szlaku zależności przedstawiono w dyskusji i dobrze, bo to jest właściwe miejsce na stawianie hipotez. Wnioski powinny wyływać z pracy i być bardzo dobrze udokumentowane. Z tego też powodu nie umieściłbym we wniosku nr 3 cytowania pracy Wójcik-Jagła i in. (2012), a we wniosku nr 6 byłbym ostrożniejszy i dodał: „... prawdopodobnie wiąże się z aktywnością cyklu ubikwitynacji”.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawioną do recenzji rozprawę mgr inż. Katarzyny Śniegowskiej-Świerk oceniam w całości pozytywnie. Uważam, że wnosi ona nowe, oryginalne dane uzupełniające naszą wiedzę o zaangażowaniu genów *HVA1* i *Srg6* w odpowiedzi na stres suszy, o potencjalnych eQTL związanych z ekspresją genów *HVA1* i *Srg6*, oraz o tym że zmiana organizacji cytoszkieletu aktynowego zachodząca w odpowiedzi na stres suszy, prowadzi do uruchomienia ekspresji genu *HVA1*. Pomimo szeregu niedoskonałości i braku precyzji wyniki zawarte w rozprawie wnoszą wiele cennych informacji stanowiąc bazę do dalszych pogłębionych badań.

Stwierdzam, że niniejsze opracowanie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr65, poz. 595 ze zmianami).

Wnoszę do Rady Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o przyjęcie pracy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Paweł Miłanowski