

Dr hab. Lidia Skuza, prof. US
Katedra Biologii Komórki
Instytut Badań nad Bioróżnorodnością
Wydział Biologii
Uniwersytet Szczeciński
Ul. Wąska 13
71-415 Szczecin

Szczecin, 6.06.2018 r.

Recenzja

pracy doktorskiej pt. „Analiza ekspresji wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne oraz kinazy MAP w warunkach stresu suszy w liniach substytucyjnych pszenicy zwyczajnej” wykonanej przez mgr inż. Karolinę Dudziak w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Kowalczyka oraz promotora pomocniczego dr Michała Nowaka

Ocena problematyki badawczej

Jednym z zagrożeń XXI wieku, dotyczącym większości obszarów Europy, w tym także Polski, jest niedobór wody, który powoduje spadki plonów sięgające nawet 40%. Przekłada się to na znaczne straty w rolnictwie. Tak więc prowadzone prace badawcze, zarówno o znaczeniu podstawowym, jak i aplikacyjnym zmierzają w kierunku otrzymania nowych odmian roślin uprawnych, znacznie efektywniej wykorzystujących dostępną wodę.

Odpowiedź rośliny na niedobór wody jest zjawiskiem złożonym, angażującym wiele mechanizmów biochemiczno-molekularnych i pomimo intensywnych badań, wciąż słabo poznanym. Deficyt wody przyczynia się do m.in. zahamowania wzrostu, zaburzeń procesu fotosyntezy, kiełkowania nasion, a także powoduje istotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, uszkadzających komponenty komórkowe. Powstanie toksycznych reaktywnych form tlenu aktywuje enzymatyczny system antyoksydacyjny, do którego należą m.in. katalaza, peroksydaza askorbinianowa i peroksydaza gwajakolu. Zależność aktywności tych trzech enzymów jest istotnym elementem w komórkowym systemie ochronnym, ponieważ odgrywa ważną rolę w kontroli powstającego i akumulowanego w komórce H_2O_2 . Reaktywna forma tlenu w postaci nadtlenu wodoru (H_2O_2) jest jednocześnie cząsteczką sygnałną aktywującą kinazy MAP,

pośredniczące w indukcji ekspresji genów kodujących przeciwutleniacze. Zmiany na poziomie transkryptomu poszczególnych składników kaskady MAP są jednym z głównych czynników determinujących transdukcję sygnału molekularnego w komórce roślinnej, jednak przetwarzanie i integracja sygnałów pochodzących ze środowiska podczas niedoboru wody nie została jeszcze w pełni opisana.

Wobec powyższego uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Dudziak, dotycząca analizy ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne oraz kinazy MAP w warunkach stresu suszy w liniach substytucyjnych pszenicy zwyczajnej, podejmuje bardzo ważną i aktualną problematykę badawczą. Temat pracy doktorskiej jest bardzo ważny i celnie wpisujący się w nurt badań prowadzonych w tym zakresie.

Formalna analiza pracy

Dysertacja liczy 140 stron i została podzielona na typowe dla pracy doktorskiej rozdziały: Wstęp obejmujący przegląd literatury, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Bibliografia. Rozdziały są podzielone na podrozdziały. Do pracy dołączono również wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Praca została napisana poprawnym stylem i językiem, a treści przedstawiane w kolejnych rozdziałach i podrozdziałach są spójne i stanowią logiczną całość.

W tekście pracy zamieszczono 43 rysunki, 5 tabel, 5 fotografii oraz cytowania 322 pozycji literaturowych, z tego jedynie 8 w języku polskim. Spośród cytowanej literatury znaczną część (ponad 87%) stanowią publikacje pochodzące z ostatniej dekady. Zakres i dobór cytowanej literatury świadczy o gruntownym przestudiowaniu opisywanej tematyki.

Merytoryczna ocena pracy

W rozdziale 1 – Wstęp i przegląd literatury (20 stron) Autorka umiejętnie przedstawia problematykę badawczą. Doktorantka skupia się nad opisem analiz genomu pszenicy, dotyczących identyfikacji chromosomów i genów zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy. Charakteryzuje także metody stosowane w tego typu badaniach. W kolejnej części tego rozdziału charakteryzuje proliny, jako jedne z ważniejszych osmoregulatorów, dehydryny, które wytwarzane są przez rośliny w odpowiedzi na warunki stresowe podczas niedoboru wody. Następnie charakteryzuje elementy systemu antyoksydacyjnego: katalazy, peroksydazy askorbinianowej, peroksydazy gwajakolowej. Rozdział jest zakończony opisem kaskady kinaz białkowych

aktywowanych mitogenami. W rozdziale Autorka scharakteryzowała również materiał badawczy, którym były linie substytucyjne pszenicy.

Rozdział ten postrzegam jako dobrze napisany. Informacje zawarte w kolejno przedstawianych akapitach całkowicie wystarczają do śledzenia wyników pracy, ich interpretacji i wyciągania wniosków.

W rozdziale drugim Autorka przedstawiła szczegółowo cele pracy, jakimi były: wybór genu referencyjnego charakteryzującego się stabilną ekspresją w roślinach pszenicy zwyczajnej w warunkach suszy indukowanej PEG na potrzeby ilościowej analizy transkryptów techniką qPCR, określenie wpływu stresu suszy na poziom mRNA genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę proliny oraz wybranych enzymów antyoksydacyjnych i kinaz MAP w siewkach linii substytucyjnych pszenicy zwyczajnej, określenie wpływu stresu suszy na parametry biochemiczne i fizjologiczne w roślinach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.), analiza zależności pomiędzy zmianami w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu, a zmianami aktywności kodowanych przez nie enzymów oraz określenie zależności pomiędzy transdukcją sygnału przez wybrane kinazy MAP, a odpowiedzią systemu antyoksydacyjnego w pszenicy zwyczajnej w warunkach stresu suszy oraz identyfikacja regionów genomu (chromosomów) pszenicy zwyczajnej związanych z szybką odpowiedzią na stres suszy.

Cele pracy zostały jasno przedstawione i właściwie sformułowane.

Rozdział Materiał i metody przedstawiony został przez Doktorantkę na 12 stronach i zawiera wszystkie informacje niezbędne do ewentualnego powtórzenia przedstawionych w pracy doświadczeń. Dobór technik badawczych jest odpowiedni, a eksperymenty zostały poprawnie zaplanowane i przeprowadzone.

Zastosowanie odpowiedniego genu referencyjnego jest kluczowym etapem w badaniach ekspresji genów. Bardzo istotne są zatem przeprowadzone przez Doktorantkę przed przystąpieniem do dalszych badań, analizy bioinformatyczne.

Na uwagę zasługuje wykorzystany w pracy materiał badawczy w postaci 18 linii substytucyjnych pszenicy zwyczajnej, stanowiący interesujący, unikalny model badawczy dla poznania i wyjaśnienia mechanizmów tolerancji na deficyt wody.

Wyniki badań Autorka przedstawiła na 38 stronach pracy, zgodnie z kolejnością wykonywanych analiz. Rozdział ten jest bogato ilustrowany rycinami, które ułatwiają interpretację wyników badań.

Praca ma trzy uzupełniające się nurty badawcze: analizy bioinformatyczne, transkryptomyczne i biochemiczne, których efektem jest kompleksowy obraz szybkiej odpowiedzi roślin na suszę, z uwzględnieniem systemu antyoksydacyjnego, poziomu peroksydacji lipidów, mechanizmu przekazywania sygnału przez kaskadę kinaz MAP oraz analizy genów zaangażowanych w syntezę proliny.

Doktorantka na podstawie uzyskanych wyników qPCR wyselekcjonowała nowy gen referencyjny. Uzyskane w pracy wyniki analiz ekspresji genów kodujących kinazy MAP pszenicy zwyczajnej w warunkach stresu suszy wykazały dwa odmienne trendy: profil ekspresji genu *MAPK3* charakteryzował się spadkiem, natomiast dla genu *MAPK6* zaobserwowano stały wzrost ekspresji przez cały czas trwania doświadczenia.

Podobnie analiza profili ekspresji genów kodujących wybrane enzymy antyoksydacyjne dała zróżnicowane wyniki. Natomiast analiza obydwu genów kodujących enzymy szlaku syntezy proliny (*P5CS* i *P5CR*) wykazywała wzrost ekspresji. Autorka wykazała także zależności pomiędzy zmianami w ekspresji badanych genów na poziomie transkrypcji, a zmianami aktywności kodowanych przez nie enzymów.

Ważnym wynikiem prac jest identyfikacja chromosomów, na których zlokalizowane są źródła genetyczne w największym stopniu zaangażowane we wszystkie opisane procesy.

Licząca 25 stron dyskusja jest bardzo dobrze napisana. Autorka zna i trafnie przywołuje, w dyskutowanych przez siebie kwestiach, odpowiednie pozycje literatury. Doktorantka podejmuje także próbę wyjaśnienia rozbieżności uzyskanych w badaniach własnych z danymi uzyskanymi przez innych autorów, co potwierdza bardzo wnikliwą analizę literatury.

Wnioski zostały sformułowane w ośmiu punktach. Są rzeczowe i odpowiadają celom badań.

Bardzo bogata bibliografia (322 pozycje), zawarta na 28 stronach dysertacji, zawiera jedynie 8 pozycji w języku polskim i tylko 40 spoza ostatniej dekady. Przystudiowanie tak obszernego zboru zasługuje na uznanie.

W obszernym tekście pracy występuje tylko kilka drobnych błędów edytorskich. Świadczy to dodatkowo o bardzo dokładnym przygotowaniu manuskryptu.

Po lekturze rozprawy nasuwają się następujące kwestie:

1. Materiał badawczy stanowiły m.in. odmiana odporna na suszę 'Saratovskaya 29' i odmiana wrażliwa 'Janetzki Probat'. Czym zdaniem Autorki można wytłumaczyć podobny obraz zmian ekspresji genu *MAPK3* i *P5CR* w tych odmianach?
2. Ten sam materiał badawczy był przedmiotem badań Osipovej i wsp. (np. 2013). Co zdaniem Autorki może powodować rozbieżności w otrzymanych wynikach?
3. Istotną rolę w badaniach odpowiedzi rośliny na stres w przypadku kultur hydroponicznych odgrywa zastosowane stężenie PEG. Na str. 109 Autorka pisze – cytując: „Na tej podstawie można wnioskować, że warunki doświadczenia, w tym także stężenie PEG, powinny zostać dobrane eksperymentalnie i zgodnie z przeznaczeniem przewidywanych wyników badań.” Czy takie doświadczenie z udziałem materiału badawczego zostało przeprowadzone?
4. Coraz większa liczba danych pojawiających się w ostatnich latach wskazuje, że istotnym elementem w kontroli ekspresji genów podczas ekspozycji na stres suszy są również modyfikacje epigenetyczne. Czy pszenica była analizowana pod tym kątem?

Wniosek końcowy

Jako recenzent odniosłam bardzo pozytywne wrażenie z lektury rozprawy doktorskiej. Temat poruszony przez Panią mgr inż. Karolinę Dudziak jest bardzo ciekawy i jednocześnie bardzo trudny. Ambitne cele stawiane w pracy zostały osiągnięte z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, a posiadana przez Autorkę wiedza wykorzystana do analizy danych doświadczalnych.

Podsumowując ocenę stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr inż. Karoliny Dudziak spełnia warunki 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. nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Wydziału Agrobiotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Dudziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na szeroki i bardzo aktualny charakter badań oraz zaprezentowanie interesujących wyników, znacznie poszerzających wiedzę z tego zakresu, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Lidia Skurka