

dr hab. inż. Mirosław Tyrka
Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki
Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza
Al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Karoliny Dudziak

pt. „Analiza ekspresji wybranych genów kodujących enzymy antyoksydacyjne oraz kinazy MAP w warunkach stresu suszy w liniach substytucyjnych pszenicy zwyczajnej”

wykonanej w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Wydziału Agrobiotechnologii pod opieką promotora Prof. dr hab. Krzysztofa Kowalczyka i promotora pomocniczego Dr Michała Nowaka

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie naukowe

Wobec postępującego ocieplania klimatu, badanie mechanizmów reakcji na suszę u cennych gospodarczo roślin, stojących u podstaw wyżywienia ludzkości, nabiera szczególnego znaczenia. Podejmowana tematyka jest ważna ze względu na rolę pszenicy jako źródła kalorii i szacowane na 30% straty plonu spowodowane zmianami klimatu. Poznanie uwarunkowań genetycznych kształtujących tolerancję na suszę u pszenicy może przyczynić się do uzyskania odmian, które będą reagowały łagodniejszym spadkiem plonu w warunkach stresu. Wykorzystanie linii substytucyjnych z pojedynczymi chromosomami odmiany wrażliwej ‘Janetzki Probat’ wprowadzanymi w tło genetyczne odmiany odpornej ‘Saratovskaya 29’ stwarza unikalne możliwości określania roli dodanych chromosomów w regulacji ekspresji wybranych genów związanych z krótkotrwałą odpowiedzią na stres. Wykorzystany materiał badawczy pozwala na badanie efektów związanych z tolerancją na suszę na poziomie chromosomów i stanowi alternatywę do metod mapowania asocjacyjnego i genetycznego. Wykorzystanie w pracy zaawansowanych materiałów uzyskanych technikami inżynierii chromosomowej nawiązuje do bogatej tradycji ośrodka w zakresie cytogenetyki zbóż.

Najbardziej zaawansowane badania podstawowe z zakresu mechanizmów tolerancji na suszę są prowadzone na gatunkach modelowych. Jednak modelowy charakter gatunków takich jak rzodkiewnik, ryż czy, kukurydza stanowi jedynie wstępny etap oceny potencjalnych

aplikacji i nie pozwala na badanie zachowania tych mechanizmów w warunkach poliploidalności z jaką spotykamy się u pszenicy.

Forma pracy i wprowadzenie

Rozprawa doktorska Pani Karoliny Dudziak ma formę monografii (140 stron) i liczy 7 rozdziałów. Tytuł precyzyjnie oddaje treść pracy. Kolejne rozdziały poprzedzone są wykazem skrótów i streszczeniem w języku polskim i angielskim. Praca zawiera wstęp i przegląd literatury (21 stron) w którym omówiono m.in. trendy zmian klimatu, znaczenie pszenicy i stresu suszy, wybrane metody analizy transkryptów i suszy, rolę i biosyntezę proliny w tolerancji na stres suszy, regulację ekspresji dehydryn, wybrane enzymy usuwające reaktywne formy tlenu i ich rolę w tolerancji na stres, system przekazywania sygnałów w oparciu o kinazy aktywowane mitogenami (MAP).

Wydaje się, że korzystne byłoby syntetyczne zbiorcze opracowanie danych o lokalizacji loci cech ilościowych (QTL) dla suszy u pszenicy oraz przedstawienie rozmieszczenia przedstawicieli badanych rodzin genów na mapie fizycznej. Praca przygotowana jest niezwykle starannie lecz, mimo to Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów. Omawiając postępy sekwencjonowania pszenicy nie wspomniano o chromosomie 3B, który był w przeszłości jedynym publicznie dostępnym fragmentem genomu pszenicy zdeponowanym w bazie NCBI. Podobnie omawiając poznane sekwencje genomów roślin użytkowych pominięto ryż. W przeglądzie literatury stwierdzono, że cyt. „W latach 1901-2005 w Europie odnotowano wzrost temperatury, który wynosił średnio około 0.9°C” nieopatrznie dodając na końcu słowo „rocznie”, podczas gdy zmiana ta dotyczy 100-lecia. **Całość wstępu jest napisana bardzo starannie a wspomniane wyżej nieprecyzyjne stwierdzenia nie utrudniają w żadnym stopniu zrozumienia treści tego rozdziału. Doktorantka w wyczerpujący i rzeczowy sposób wprowadziła w tematykę pracy.**

Cele rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

Pięciopunktowy cel rozprawy został jasno sprecyzowany. Opis materiałów i metod liczy 12 stron. Jeśli chodzi o badane linie to częściowa charakterystyka cech morfologicznych i użytkowych znalazła się w przeglądzie literatury natomiast wydaje się, wskazane uzupełnić ten opis o charakterystykę genetyczną markerami mikrosatelitarnymi (Pestsova et al. 2000). Badania te wyjaśniają dlaczego użyty zestaw linii nie jest kompletny (brakuje linii dla 3 chromosomów).

Bardzo cennym elementem pracy jest wykorzystanie kultury hydroponicznej do testowania suszy. Przy planowaniu doświadczenia wykorzystano prawidłowo nowoczesne narzędzia bioinformatyczne. Przy projektowaniu tego typu doświadczeń zawsze jest ryzyko, że uzyskana z bazy danych sekwencja będzie się różniła od tej obecnej w badanym genotypie, dlatego wykorzystanie fragmentów konserwatywnych z jednej strony zapewnia udaną amplifikację a z drugiej strony nie pozwala na szczegółowe analizy zmian w poziomie ekspresji poszczególnych przedstawicieli rodziny genów.

Znanych jest wiele zaawansowanych technologicznie metod analizy różnic w poziomach ekspresji mRNA na poziomie całych transkryptomów lecz w końcowym etapie metoda qPCR jest zwykle stosowana do walidacji uzyskiwanych efektów. Przedstawiona metodyka wykorzystująca sondy TaqMan należy do najbardziej precyzyjnych wariantów metody qPCR. Przepuszczalnie wykorzystanie różnych kombinacji fluoroforów dla poszczególnych badanych genów pozwoliłoby na multipleksowanie reakcji i zmniejszenie nakładów pracy. Bardzo interesujące są analizy biochemiczne pomiaru stopnia peroksydacji lipidów, aktywności katalazy, peroksydazy askorbinianowej i peroksydazy gwajakolu ponieważ otwierają możliwości dokładnej charakterystyki aktywności i regulacji różnych izoform enzymów.

Najważniejsze uzyskane wyniki i uwagi *krytyczne*

Omówienie wyników (39 stron) jest bogato dokumentowane wykresami. W pierwszej części wyselekcjonowano gen referencyjny AP-5 o stabilnej ekspresji w warunkach stresu suszy. Etap ten świadczący o dużej rzetelności wykonywanych analiz. Jednak w przypadku metody określania względnej ekspresji genu obok stabilności poziomu ekspresji genu referencyjnego ważna jest również wydajność amplifikacji – czy były jakieś istotne różnice w nachyleniu krzywych amplifikacji kandydujących genów referencyjnych i badanych genów docelowych? W dalszej części przedstawiono zmiany w ekspresji genów sygnalizujących stres (MAPK3 i MAPK6), kodujących enzymy antyoksydacyjne (CAT, APX, GPX) oraz genów biorących udział w syntezie proliny (P5CS i P5CR) w trzech terminach. W kolejnej części przedstawiono wyniki analiz biochemicznych peroksydacji lipidów oraz aktywności CAT, APX i GPX. Wyniki omówiono w oparciu o statystycznie istotne różnice. Można mieć jedynie sugestię, czy na wykresach (13, 14, 18, 19, 20, 23 i 24) przedstawiających zmiany ekspresji skala logarymiczna nie byłaby bardziej czytelna – bo wtedy można zobaczyć poziom względnej ekspresji równy 1, który oznaczałby brak zmian w odniesieniu do genu referencyjnego. Jeśli chodzi o wykresy do części biochemicznej (szczególnie rys. 38) to wydaje

się, że przedstawione słupki SD są jednakowe dla każdej badanej linii – nie wiem na ile ta uwaga może odnosić się do wcześniejszych wykresów (25, 30 i 34).

W dyskusji (26 stron) przedstawiono bardzo wnikliwą analizę wyboru genu referencyjnego. Przy omawianiu kinaz MAP Autorka wskazuje na perspektywiczne kierunki badań. Uważam, że Doktorantka nie powinna się ograniczać tylko do zaproponowania chromosomów związanych ze zmianami aktywności badanych genów. Genom pszenicy jest dość dobrze scharakteryzowany i przypuszczalnie dla badanych genów można uzyskać sekwencje znanych transkryptów i przewidzieć najbardziej prawdopodobne lokalizacje na mapie fizycznej. Wtedy zmiany aktywności można próbować łączyć z umiejscowieniem genu na określonym chromosomie. Cała dyskusja świadczy o dużej wiedzy Doktorantki w szerokim zakresie zagadnień poruszanych w pracy. Pracę kończą właściwie sformułowane wnioski, oraz obejmujący 32 strony spis literatury zawierający 322 pozycje.

Praca jest napisana bardzo starannie. Błędy edytorskie i w cytowaniach są bardzo rzadkie.

Wniosek końcowy

W pracy zbadano szybką odpowiedź na stres osmotyczny w zestawie linii substytucyjnych. Uzyskano nowe informacje o reakcji roślin mierzone zmianami ekspresji wybranych genów i aktywności enzymatycznej. W efekcie badań dobrano optymalny gen referencyjny i uzyskano cenne informacje z zakresu genomiki funkcjonalnej pszenicy.

Rozprawę doktorską Pani Karoliny Dudziak należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu nowoczesnej metodyki, co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim. Praca jest oryginalnym opracowaniem naukowym i świadczy o dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji pracy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim w artykułe 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz w rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r. poz. 261). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Dudziak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

/Mirośław Tyrka/

