

Kraków, 15 listopada 2021

Prof. dr hab. Marcin Rapacz
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie
ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Collin pt. „Analiza roli genu *HvABI5* w odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.).”

Wprowadzenie

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Collin obejmuje bardzo ważne zagadnienie jakim jest reakcja roślin na deficyt wody w glebie. Wraz z postępującymi zmianami klimatycznymi zakres występowania tego zjawiska będzie się zwiększał. Dotyczy to również terytorium Polski. Dla utrzymania obecnego poziomu produkcji rolniczej oznacza to wyzwanie wymuszające stosowanie rozwiązań agrotechnicznych dostosowujących systemy produkcji rolniczej do warunków suszy. Poza płodozmiannem (doborem gatunków roślin), poprawą właściwości gleb, w tym retencji wody w środowisku, pożądana jest też selekcja genotypów dotychczas uprawianych i ważnych gospodarczo gatunków roślin w kierunku poprawy wykorzystania wody aby możliwe było uzyskanie podobnego plonu części użytkowej przy zużyciu w okresie wegetacji mniejszej ilości wody.

Praca doktorantki dotyczy analizy funkcji jaką w tolerancji stresu suszy u jęczmienia pełni jeden z czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w transmisję sygnału kwasu abscysynowego (ABA).

W świetle podanych przeze mnie informacji wstępnych już w tym miejscu prosiłbym doktorantkę o próbę określenia, czy wprowadzenie zmutowanego wariantu białka *HvABI5* do odmian współcześnie uprawianych poprawi ich plonowanie w warunkach polowych. Pytanie wbrew pozorom nie ma charakteru rolniczego a raczej środowiskowo – ewolucyjny.

Ocena pracy od strony formalnej

Jako rozprawa przedłożona została monografia napisana w języku polskim. Liczy ona 160 stron. Załączono dodatkowo 13 aneksów – materiałów uzupełniających oraz dwa artykuły

naukowe opublikowane w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science* z pierwszym autorstwem doktorantki. Pierwszy z nich (Skubacz (Collin) A., Daszkowska-Golec A., Szarejko I. 2016. The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Front. Plant Sci.* 7:1884) jest artykułem przeglądowym, natomiast w drugim (Anna Collin, Agata Daszkowska-Golec, Marzena Kurowska, Iwona Szarejko 2020. Barley ABI5 (Abscisic Acid INSENSITIVE 5) is involved in abscisic acid-dependent drought response. *Front. Plant Sci.* 11:1138) zawarto część wyników wchodzących w zakres rozprawy.

Ryciny z artykułu przeglądowego zostały poprawnie zacytowane w rozprawie z uwzględnieniem wymagań licencji CC-BY (uznanie autorstwa). Jednakże część ilustracji z drugiej pracy nie została odpowiednio oznaczona. Dla przykładu Ryc. 18B jest tożsama z Fig. 9B w publikacji, 17 z 9A, 15 z 11, itd. Brak odnośnika do źródła jest formalnym niedociągnięciem stanowiąc naruszenie warunków licencji, choć samo użycie w monografii wspomnianych rycin/wyników oraz ich modyfikacja są oczywiście dopuszczalne. Nie do zakwestionowania jest też znaczący udział doktorantki w uzyskaniu wzmiankowanych wyników.

Praca napisana została w układzie typowym dla rozpraw doktorskich będących monografiami. W pracy zamieszczono 33 ryciny z których większość przedstawia wyniki badań, trzy z nich umieszczono we wstępie, a jedną w rozdziale opisującym materiał badawczy i metodykę badań. Praca zawiera też siedem tabel: sześć w rozdziale „wyniki” i jedną we wstępie. Ryciny i Tabele są czytelne i starannie wykonane.

Ocena merytoryczna pracy

Celem pracy była analiza funkcjonalna genu *HvABI5* w odpowiedzi na stres suszy, a także identyfikacja genów potencjalnie docelowych dla *HvABI5*, które uczestniczą w ABA-zależnej odpowiedzi jęczmienia na suszę.

W rozdziale wstęp i cel pracy doktorantka krótko scharakteryzowała problem badawczy, sformułowała cel swojej pracy oraz hipotezy badawcze. Zaprezentowała też metodologię badań w odniesieniu do postawionych hipotez co zasługuje na szczególną pochwałę.

W rozdziale przegląd literatury doktorantka przedstawiła problem stresu suszy i konsekwencji jego występowania, mechanizmy adaptacji roślin do warunków stresu suszy oraz metabolizm i sygnalizację kwasu abscysynowego (ABA). Najwięcej miejsca poświęciła czynnikom transkrypcyjnym bZIP działającym zależnie od ABA, w tym przede wszystkim

przedmiotowemu w niniejszej pracy ABI5. Zawarte w przeglądzie literatury informacje są pełne i wystarczające. Za szczególnie wartościowe należy uznać przedstawione w tym rozdziale schematy i zestawienie tabelaryczne. Pewne zastrzeżenia może budzić jedynie zaprezentowana przez doktorantkę typologia strategii adaptacji roślin do warunków deficytu wody. Po pierwsze powinny być one wymienione i usystematyzowane przed opisaniem mechanizmów reakcji na suszę, gdyż mechanizmy te są często różne w różnych strategiach. Po drugie przedstawiony podział na strategię unikania, tolerancji i ucieczki jest uproszczony i niepełny. Na tym tle poprosiłbym doktorantkę o próbę pełnej klasyfikacji mechanizmów adaptacyjnych roślin do warunków deficytu wody w środowisku i zaklasyfikowanie do odpowiednich strategii dwóch gatunków: *Asteriscus aquaticus* (L.) Less. i *Echinopsis spachiana* (Lem.) Friedrich & G. D. Rowley, reprezentujących skrajnie odmienne strategie, nie bardzo mieszczące się w klasyfikacji przedstawionej w rozprawie.

W pracy zastosowano szereg metod fizjologicznych (pomiar fluorescencji chlorofilu, wpływu elektrolitów, względnej zawartości wody, zawartości proliny, flawonoli, antocyjanów, chlorofilu, czy pomiar przewodnictwa szparkowego), molekularnych (analiza transkryptomu, RT-qPCR) i bioinformatycznych (np. przewidywanie wpływu mutacji na funkcję białka HvABI5, czy analiza sekwencji promotorowych). Ich opis w rozdziale materiały i metody jest kompletny, a same metody zastosowane zostały w sposób adekwatny do założonego celu prowadzonych badań. Warto podkreślić, że podana charakterystyka fizjologicznej reakcji mutantów na suszę uwzględniała wszystkie istotne parametry, a użyte metody molekularne i bioinformatyczne były konieczne i wystarczające dla weryfikacji założonych hipotez badawczych. Jest to nad wyraz poprawne i stanowi zaprzeczenie ostatnio coraz powszechniejszych praktyk związanych z prezentowaniem w pracach naukowych nadmiarowej ilości danych. Utrudnia to czytelnikowi samodzielną interpretację obserwowanych zjawisk, a autorom poprzez wskazywanie konkretnych wyników daje dość swobodną możliwość potwierdzania stawianych tez. Godny pochwały jest też ściśle kontrolowany i bardzo dobrze opisany sposób poddawania roślin działaniu suszy.

W opisach stosowanych metod nie znalazła się jedna istotna informacja. W przypadku analiz RT-qPCR podano, że używano dwóch genów referencyjnych, podczas gdy przedstawiony i omawiany wzór na obliczenia względnej ekspresji genów uwzględnia tylko jeden gen referencyjny. Prosiłbym o wyjaśnienie w jaki sposób w obliczeniach uwzględniano poziom ekspresji dwóch genów referencyjnych.

W rozdziale wyniki uwagę zwraca bardzo usystematyzowane podejście do kompletnego rozwiązania problemu badawczego. Na początku doktorantka przedstawiła analizę

filogenetyczną *HvABI5* oraz jego homologów, jak również charakterystykę genetyczną mutantu *hvabi5.d* stanowiącego materiał badawczy w pracy. Następnie przedstawiono wyniki badań nad wpływem ABA na kiełkowanie, rozwój siewek oraz przebiegu fotosyntezy mutantu oraz odmiany Sebastian. Kolejny blok badań obejmował analizę fizjologicznej odpowiedzi siewek *hvabi5.d* oraz odmiany Sebastian na stres suszy oraz analizę ekspresji *HvABI5* oraz genów opisanych w literaturze jako bezpośrednio regulowane przez HvABI5 w suszy.

W dalszej części rozdziału przedstawiono wyniki pomiarów wykonanych po stresie suszy. U *hvabi5.d* oraz u odmiany Sebastian analizowano ekspresję genów szlaku sygnalizacji i metabolizmu ABA oraz zawartość endogennego ABA.

W kolejnym kroku doktorantka przeprowadziła analizę bioinformatyczną promotorów wybranych genów uczestniczących w szlaku sygnałowym dla ABA pod względem obecności elementów rozpoznawanych przez HvABI5.

W celu potwierdzenia hipotezy, że HvABI5 reguluje odpowiedź na suszę na drodze ABA-zależnej u *hvabi5.d* oraz u odmiany Sebastian wykonano dodatkowo pomiar przewodnictwa szparkowego oraz analizę ekspresji genów szlaku reakcji na ABA po traktowaniu ABA.

W końcu przedstawiono wyniki globalnej analizy transkryptomu *hvabi5.d* oraz odmiany Sebastian bezpośrednio po osiągnięciu docelowej, obniżonej wilgotności gleby oraz po 10-dniach wzrostu roślin w tych warunkach. Na podstawie tej analizy oraz analizy regionów promotorowych genów ulegających zróżnicowanej ekspresji pod kątem obecności elementów *cis* ABRE wskazano geny potencjalnie docelowe dla HvABI5. W końcu zmiany w ekspresji tych wytypowanych genów po traktowaniu suszą oraz ABA zostały przeanalizowane przy użyciu ilościowego RT-PCR.

Uzyskane wyniki przedyskutowano w sposób zrozumiały i kompetentny wykorzystując przy tym wszystkie znaczące publikacje naukowe związane z tematyką rozprawy. W dyskusji skupiono się na mechanizmie tolerancji *hvabi5.d* wobec stresu suszy, w tym jego ABA-zależnej odpowiedzi na ten stres. Przedyskutowano też możliwą rolę HvABI5 w regulacji innych ścieżek fitohormonalnych podczas suszy oraz możliwość regulacji przez to białko potencjalnych genów docelowych. W końcu poruszono też istotny problem potencjalnego wpływu mutacji tła powstałych w wyniku mutagenyzy chemicznej na fenotyp badanego mutantu.

W pracy zacytowano 255 pozycji literatury, głównie artykułów naukowych, ale też raport statystyczny FAO. W znakomitej większości są to pozycje opublikowane w ostatnim dwudziestoleciu w renomowanych czasopismach o zasięgu ogólnościowym.

W pracy sformułowano 12 wniosków. Odnoszą się one do najważniejszych wyników pracy i są w większości całkowicie poprawne. Pewne zastrzeżenia budzą wnioski 4 i 7. We

wniosku 4 nie sprecyzowano o jakie membrany chodzi, a ponadto wskazano, że zmiana szybkości zamykania aparatów szparkowych może być wytłumaczona zmianą w ekspresji genów w trakcie działania stresu. Z kolei we wniosku 7 szybsze zamykanie aparatów szparkowych wiązane jest z udziałem *HvABI5* w regulacji biosyntezy i/lub katabolizmu chlorofilu oraz przebiegu fotosyntezy. Wyniki uzyskane w pracy oraz dotychczasowa wiedza na temat regulacji ruchów aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres suszy sugerują, że szybsze zamykanie aparatów szparkowych wiązać może się raczej ze zmienioną sygnalizacją ABA, a nie zmianami w ekspresji genów, czy w procesie fotosyntezy.

Wniosek 12 nie jest z kolei wnioskiem ponieważ dotyczy przyszłych, niewykonanych jeszcze przez doktorantkę badań.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie uznać należy wykazanie obecności potencjalnych motywów wiązania ABI5 w promotorach *HvNCED1*, *HvSnRK2.1* oraz *HvPP2C4* co może świadczyć, że *HvABI5* moduluje biosyntezę oraz sygnalizację ABA na zasadzie sprzężenia zwrotnego oraz wskazanie, że ABA-zależne mechanizmy działania *HvABI5* w trakcie kiełkowania nasion i odpowiedzi na suszę w stadium wegetatywnym są odmienne.

Ocena strony redakcyjnej i językowej pracy

Strona redakcyjna pracy nie budzi zastrzeżeń. Praca została napisana jasnym, zrozumiałym i na ogół poprawnym językiem właściwym dla prac naukowych. W pracy dostrzec można jednak drobne nieścisłości, wynikające najczęściej ze stosowania żargonu naukowego. Dla przykładu zdaniem doktorantki fluorescencja chlorofilu była analizowana przy pomocy testu JIP, podczas gdy ten test służy do analizy kinetyki zmian intensywności fluorescencji chlorofilu. Podobnie „próbki poddano chromatografii cieczowej” zamiast „zawartość ABA analizowano z wykorzystaniem chromatografii cieczowej”. Innym przykładem używania żargonu laboratoryjnego jest stwierdzenie: „jeżeli poziom ekspresji różnił się przynajmniej dwa razy pomiędzy 10 i 15 dniem suszy” co można błędnie zinterpretować jako fakt dwukrotnej zmiany poziomu ekspresji w ciągu tych 5 dni (np. wzrosła w dniu 2 i spadła w dniu 4). Stosowaną jednostką „natężenia światła” był $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a nie $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Wielokrotnie przewija się w pracy stwierdzenie, że w trakcie działania suszy dochodziło do „adaptacji”. Doktorantka pisze też o „obniżaniu wilgotności w glebie”. Takie sformułowanie prowokuje pytanie: wilgotności czego w glebie?

Te i inne wymienione wcześniej uchybienia nie wpływają na merytoryczną wartość przedłożonej mi do recenzji rozprawy, stanowią przede wszystkim materiał do ciekawej dyskusji naukowej w trakcie obrony pracy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Rozprawa doktorska Pani Anny Collin stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań, co jest ustawowym wymaganiem stawianym rozprawom doktorskim.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona kryteria stawiane w Artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Uznaję również, że w przypadku recenzowanej pracy spełnione zostały przesłanki wynikające z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. „Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” umożliwiające przeprowadzenie niniejszego postępowania na dotychczasowych zasadach. Ponieważ nadanie stopnia doktora nastąpi w tym przypadku po dniu 30 kwietnia 2019 roku stopień naukowy zostanie nadany w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne, czyli zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 5 ust. 3 cytowanej wyżej ustawy.

W związku z powyższymi wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Anny Collin do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania stopnia naukowego doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.


Prof. dr hab. Marcin Rapacz