

Poznań, 21 grudnia 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Anny Collin
pt. „Analiza roli genu *HvABI5* w odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia (*Hordeum vulgare*
L.)” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Szarejko,
promotor pomocniczy Agata Daszkowska-Golec**

W ostatniej dekadzie narastające na sile okresowe susze przypadające na okres początku wegetacji roślin stają się coraz większym zagrożeniem dla gatunków uprawnych. Susza i spadek plonów, a w skrajnym przypadku ich brak, to nie tylko poważny problem gospodarczy ale przede wszystkim problem społeczny, który wiąże się z dostępem do zasobów roślinnej żywności - głównie zbóż, które są podstawowym produktem zaspokajającym potrzeby pokarmowe na świecie. Utrzymanie produkcji zbóż na obecnym poziomie w dobie zmian klimatycznych to ważne wyzwanie. Podjęła się go Autorka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Aby dołożyć cegiełkę w badaniach nad opracowaniem nowych odmian jęczmienia Autorka dokonała analizy funkcjonalnej genu *HvABI5* w odpowiedzi na stres suszy. Wyniki swojej pracy Doktorantka przedstawia w formie monografii napisanej w języku polskim, o typowej strukturze (wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura), liczącej 288 stron, włączając aneks z dwiema publikacjami, których jest współautorem.

Celem badań Doktorantki jest analiza funkcjonalna *HvABI5* w odpowiedzi na suszę oraz identyfikacja genów regulowanych przez *HvABI5* i ABA w warunkach stresu suszy. Prace badawcze były prowadzone z wykorzystaniem tillingowego mutantu jęczmienia jarego w genie *HvABI5* - *hvabi5.d* i porównywane z odmianą Sebastian. Jednoznacznie stwierdzam, że Autorka osiągnęła zamierzone cele rozprawy. Przegląd literaturowy doskonale wprowadza w zagadnienia poruszane w pracy. Autorka wnikliwie omówiła stres suszy oraz mechanizmy adaptacji roślin do jego warunków. Następnie szczegółowo omówiła metabolizmu kwasu abscysynowego (ABA), dokonała charakterystyki komponentów rdzeniowej sygnalizacji ABA i wybranych efektorów

tejże sygnalizacji. Autorka wyczerpująco omówiła rolę AtABI5 jako regulatora odpowiedzi na stres podczas kiełkowania i w rozwoju wegetatywnym. Rzetelnie przedstawiła fenotypy znanych mutantów w genie *ABI5*, starannie podsumowała regulację i obrót białkiem ABI5. W finale wprowadzenia literaturowego Autorka omawia rolę i znaczenie homologów genu *AtABI5* u roślin jednoliściennych. Ta część rozprawy jest rozmyślnie zaplanowana i wysoce oryginalna.

W kolejnej części rozprawy „Materiały i Metody” znajdujemy opis zastosowanych metod badawczych wraz z niektórymi stosowanymi odczynnikami oraz charakterystykę materiału badawczego. W zasadzie nie mam większych zastrzeżeń do zawartych treści opisowych metod, są utrzymane w konwencji publikacji z odnośnikami literaturowymi. Co prawda tego typu forma opisu jest rzadko spotykana w rozprawach, chroni także know-how autora, ale zdecydowanie jest znacząco mniej precyzyjna i zmniejsza powtarzalność opisywanych eksperymentów w zakresie stosowanym w pracy. Moje wątpliwości budzi jednak brak spisu odczynników i materiałów używanych w pracy. Autorka nie podała składów niektórych odczynników lub nie wiadomo, która jego wersja została użyta w pracy, np. nie mam jasności który izomer kwasu abscysynowego (ABA) był stosowany do indukcji roślin +ABA a może ±ABA? Nieuzasadnione było umieszczenie składu pożywki do podlewania jęczmienia w aneksie. Zdecydowane ten rozdział pracy mógł być lepiej zaplanowany.

Opis „Wyników” Doktorantka rozpoczyna od analizy filogenetycznej białek typu ABI5, poszukując związków ewolucyjnych pomiędzy analizowanymi sekwencjami. W rezultacie analiz otrzymała trzy kłady: I - z 9 białkami, w tym HvABI5; II z 6 białkami (w tym AtABI5) oraz III zawierający AtAREB3, OsABF1 oraz HvABF3. HvABI5 wykazywał najwyższe podobieństwo sekwencji do wABI5 (94,3%), a w analizie filogenetycznej tworzył gałąź wspólną z wABI5, OsABF4, OsTRAB1, OsABF2 oraz ZmABI5. Zastawiające w tej analizie są dwie kwestie:

- 1) biorąc pod uwagę wielkość genomu jęczmienia spodziewałabym się więcej niż jednej kopii HvABI5. Nasuwa się więc pytanie czy Autorka analizowała genom jęczmienia w tym względzie?;
- 2) analiza filogenetyczna przedstawiona w pracy jest dość uboga pod kątem uwzględnionych w niej białek. Nasuwa się pytanie w jaki sposób dokonano wyboru białek do tej analizy?

Następnie Autorka uzasadnia wybór mutantu *hvabi5.d* do analiz podając, że we wstępnych badaniach ta lina roślinna z populacji HorTILLUS charakteryzowała się podwyższoną względną zawartością wody w warunkach suszy w porównaniu z linią „Sebastian”. Na poziomie molekularnym u *hvabi5.d* zidentyfikowano mutację typu tranzycja G1751A, która skutkuje substytucją argininy w lizynę w pozycji 274 (R274K). Charakterystyka fenotypowa mutantu *hvabi5.d* dokumentuje funkcjonowanie HvABI5 w warunkach suszy i jako efektor ABA. Na poziomie kiełkowania oraz wzrostu korzenia mutant *hvabi5.d* wykazuje obniżoną wrażliwość na ABA w porównaniu z linią wyjściową „Sebastian” oraz dwukrotnie wyższy poziom proliny. W warunkach suszy w odniesieniu do linii wyjściowej obserwuje się u niego obniżony wyciek jonów, znaczący wzrost flawonoidów, redukcję przewodnictwa szparkowego podczas obniżania wilgotności w glebie, a także niższą wydajność procesu fotosyntezy. Autorka wnioskuje, że poziom tolerancji na stres u badanego mutantu ma złożony charakter i jest skorelowany z podwyższonym poziomem osmoprotektantu proliny i adaptacji w regulacji ruchów aparatów szparkowych. W pełni zgadzam się z tym stwierdzeniem. Uzasadnienia fenotypu mutantu *hvabi5.d* Autorka poszukuje także w zmianach poziomu transkryptów genów docelowych dla HvABI5. W tym miejscu pracy zabrakło mi jednak jednoznacznej konkluzji argumentującej, że obserwowany profil ekspresji dla HVA1 oraz HVA22 rzeczywiście wyjaśnia (i jaki sposób) podwyższony poziom tolerancji na suszę u mutantu *hvabi5.d*.

W kolejnym etapie prac Autorka analizowała poziom transkrypcji genów zaangażowanych w sygnalizację i metabolizm ABA, a także sprawdziła poziom endogennego ABA u mutantu i linii wyjściowej. Autorka stawia ciekawą hipotezę, że HvABI5 może być „modulatorem aktywności szlaku sygnałowego ABA”. W świetle przedstawionych wyników analizy transkrypcyjnej niejasne są dla mnie założenia analiz (analiz przedstawionych na rys.13 i 15) Doktorantka zakłada, że HvABI5 jest pozytywnym czy negatywnym regulatorem transkrypcji? Ponadto niezrozumiałą jest dla wybór wskazanych genów tj. *HvPYL5*, *HvSnRK2.1*, *PP2C4* jako potencjalnie docelowych dla HvABI5.

W końcowym etapie pracy Doktorantka przeprowadza analizę transkryptomu mutantu *hvabi15* oraz linii rodzicielskiej „Sebastian” w warunkach: 1) optymalnego nawodnienia (10 DAS); 2) w warunkach obniżonej wilgotności 3%VWC oraz 3) po 10 dniowym stresie suszy (1,5-2% VWC). Otrzymane wyniki (poziomy zmian, a w zasadzie ich trendy) zostały potwierdzone z użyciem alternatywnej metody do badania transkryptomu – RT-qPCR. W rezultacie analiz otrzymano:

- 1) w warunkach optymalnego nawodnienia (10 DAS) – 933 *geny* o zróżnicowanej ekspresji u mutantu: dla 331 genów odnotowano wzrost transkrypcji a dla 602 genów jej spadek;
- 2) w warunkach obniżonej wilgotności (15 DAS w odniesieniu do 10 DAS); u mutantu: 1240 *genów o podwyższonej transkrypcji*, w tym dla 670 genów specyficznym ulegających indukcji transkrypcji u mutantu; oraz 3268 genów o istotnie obniżonej ekspresji u mutantu, w tym 2018 genów, których transkrypcja była specyficznym hamowana u badanego mutantu; u odmiany Sebastian zidentyfikowano specyficzną ekspresję dla 441 genów: ↑201 genów, ↓240 genów.
- 3) w warunkach suszy u mutantu zanotowano: 1776 genów charakteryzujących się wzrostem transkrypcji i 4222 *geny*, których poziom transkrypcji ulegał obniżeniu u mutantu: „specyficzny profil dla mutantu” to ↑625 genów, ↓1334 genów; u odmiany Sebastian zidentyfikowano specyficzną ekspresję ↑329 genów, ↓436 genów.

Mam w tym miejscu wątpliwość odnośnie analiz statystycznych. W metodach podano, że analizę dla warunku 10 DAS prowadzono z użyciem testu *t* -studenta (1ANOVA: jedna zmienna - mutacja) w przypadku analiz dla 15 DAS i w warunkach suszy analizy prowadzono z użyciem 2ANOVA. W tym ostatnim przypadku (porównań 2ANOVA) spodziewałabym się trzech wartości *P* dla tych analiz (2 zmienne: mutacja, obniżona wilgotność/susza i parametr interakcja). Zatem, o którą wartość *P* opierają się przedstawione w pracy analizy?

Do opisanie obrazu transkryptomu w badanych warunkach wykorzystano klasyczne metody bioinformatyczne: Gene Ontology (GO), analizy promotorów, koncepcyjne weryfikacje wyników z analiz transkryptomowych. Za wyjątkowo cenną uznaję analizę w poszukiwaniu genów docelowych dla HvABI5. Co prawda otrzymane wyniki należy traktować jako wyniki wstępne ale są z pewnością stanowią solidną bazę do dalszej charakterystyki funkcjonowania HvABI5.

W rozdziale dyskusja Doktorantka obszernie i interesująco podsumowuje zgromadzone wyniki. Nie mam większych zastrzeżeń do tego rozdziału poza jednym. Zabrakło mi opinii Doktorantki na temat funkcjonowania HvABI5 jako potencjalnego aktywatora lub represora transkrypcji.

Podsumowanie

W świetle przedstawionej argumentacji pozostaje stwierdzić, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są w pełni oryginalne i interesujące. Zgłoszone powyżej komentarze i uwagi nie umniejszają wartości naukowej recenzowanej rozprawy, zdecydowanie stanowią przyczynek do dalszej dyskusji. Na uznanie zasługuje również fakt, że zarówno przegląd literaturowy jak i wyniki zawarte w rozprawie zostały już opublikowane. Dlatego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Anny Collin spełnia warunki zawarte w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późn. zm.). Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – c r. poz. 1669).

