

Radzików, 04. 02. 2022

Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

Zakład Genomiki Funkcjonalnej

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Radzików, 05-870 Błonie

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Aleksandry Smoczyńskiej pt. „Rola jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego MADS27 i jego regulatora mikroRNA444 w odpowiedzi rośliny na niedobór i nadmiar azotu”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Badania koncentrują się na bardzo ważnej tematyce związanej z regulacją wydajności upraw w powiązaniu z gospodarką azotową. Obiektem badawczym jest jęczmień, jedno z najważniejszych zbóż uprawianych w klimacie umiarkowanym. Zarówno niedobór azotu jak również jego nadmiar wpływa niekorzystnie na plonowanie upraw. Ponadto jego nadmiar jest bardzo szkodliwy dla środowiska. Pokazanie mechanizmu regulacji azotu w warunkach jego nadmiaru w środowisku jest bardzo cenne nie tylko w kontekście badań podstawowych ale jednocześnie może posłużyć do celów aplikacyjnych. Co ważne, badania Doktorantki są kontynuacją wcześniejszych badań zespołu prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej, w których zidentyfikowano trzy geny kodujące miRNA z rodziny *MIR444* oraz dwa geny docelowe.

Dobrym wprowadzeniem do przedmiotu rozprawy i jego znaczenia jest opisany przez Doktorantkę wstęp. Omówiła w nim kolejno metabolizm jonów azotanowych i amonowych u roślin oraz rodziny genów biorące udział w pobieraniu, asymilacji, translokacji i remobilizacji azotu; stres niedoboru/nadmiaru azotu, związek z fitohormonami, zwłaszcza ABA oraz scharakteryzowała rodzinę genów *MIR444* i czynniki transkrypcyjne posiadające domenę MADS-box. Podkreśliła znaczenie tych czynników w regulacji rozwoju korzenia i sygnalizacji fitohormonów (auksyn, brassinosteroidów) oraz akumulacji azotanów u ryżu, (gdzie miRNA444 pośredniczy w regulacji jednego z MADS).

Szczegółowe cele i zastosowane metodyki badawcze

Celem pracy była charakterystyka biologicznej funkcji jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 oraz regulującego ten czynnik mikro RNA, miRNA444c. Był on realizowany przez 1) analizę wzoru ekspresji genów kodujących obie cząsteczki, 2) identyfikację elementów regulatorowych znajdujących się w ich promotorach, 3) analizę fenotypową modyfikowanych genetycznie linii jęczmienia z obniżonym poziomem ekspresji i nadekspresją *HvMADS27*, oraz 4) identyfikację genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny HvMADS27. Hipoteza/hipotezy badawcze nie zostały zamieszczone.

Już na tym etapie pracy odnotowano niezrozumiały dla czytelnika system oznaczania genów i białek. Słowo „ekspresja” dotyczy zwykle ekspresji genów a ich nazwy zawsze pisane są kursywą. Odpowiadające im białka mają tę samą nazwę pisaną czcionką zwykłą. Niestety te zasady nie są ściśle przestrzegane. Ponadto co oznacza hvMADS27, który wydaje się, że jest stosowany zamiennie z HvMADS27?

Druga uwaga dotyczy określenia „mutanty”, które stosuje się zwyczajowo do roślin edytowanych, z ukierunkowaną mutacją w genie. Rośliny transgeniczne z wprowadzoną kasetą obniżającą ekspresję genu lub wywołującą nadekspresję nie jest mutacją.

Materiały i metody Doktorantka opisała jako oddzielne rozdziały. W rozdziale materiały na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że do badań przygotowano wszystkie właściwe kombinacje linii jęczmienia. Były to rośliny typu dzikiego oraz linie z obniżonym poziomem ekspresji i nadekspresją badanego genu, zapewniając w ten sposób uzyskanie pełnej informacji o funkcji badanych genów. Badania z tak dobranym materiałem roślinnym mogą być publikowane w czasopismach o bardzo wysokim współczynniku wpływu, tzw. IF. Brakuje jednak szczegółowych opisów, dlatego proszę Doktorantkę o wytłumaczenie co to „etykieta c-myc” i w jakim celu została użyta do klonowania i otrzymania modyfikowanych linii.

W sposób dość lapidarny opisano rozdział o wektorach: wymieniono użyte w badaniach wektory, do części z nich załączając dostępne mapy. W dalszej kolejności wymieniono użyte odczynniki, roztwory i przeciwciała, omówiono skład pożywek bakteryjnych oraz roślinnych wykorzystywanych do uprawy i wzrostu roślin (nie hodowli) oraz kultury *in vitro*. Przy omawianiu roztworów niektóre informacje można by było połączyć, zwłaszcza te powtarzające się wielokrotnie o tym samym sposobie sterylizacji i warunkach przechowywania. Chciałabym tu zwrócić uwagę na nieprawidłowe używanie pojęcia „hodowla roślin”, które stosuje się w przypadku wyprowadzania nowych odmian. Wg Wikipedii: hodowla „jest nauką traktującą o polepszaniu cech dziedzicznych u roślin

uprawnych,...”. Uprawa lub wzrost roślin do celów doświadczalnych nie jest hodowlą. W rozdziale metody Doktorantka przedstawiła bardzo bogaty warsztat badawczy, na który składają się następujące techniki: izolacja RNA i przepisywanie na cDNA, amplifikacja techniką 5’/3’ RACE, przygotowanie dwóch konstruktów do transformacji genetycznej w celu uzyskania nadekspresji lub obniżenia ekspresji genu *HvMADS27* w systemie pBRACT, klonowanie z użyciem odpowiednich szczepów *E. coli* i *A. tumefaciens*, PCR w czasie rzeczywistym, hybrydyzacja Northern, przygotowanie bibliotek małych RNA, immunoprecypitacja chromatyny, ekstrakcja i detekcja białek, transformacja niedojrzałych zarodków jęczmienia oraz selekcja i regeneracja „transgeniczných” roślin, analiza systemu korzeniowego, wrażliwości na kwas abscysynowy (ABA), pomiar stężenia azotu i ABA w korzeniach.

Mimo tak bogatego warsztatu, jeden z bardzo ważnych aspektów badawczych nie został uwzględniony. W opisie metody „selekcja i regeneracja transgeniczných roślin” nie napisano nic na temat potwierdzenia ich transgeniczności, tj. wbudowania skonstruowanych kaset do genomu wyselekcjonowanych roślin. Sama selekcja nie jest wystarczającym potwierdzeniem uzyskania roślin transgeniczných i użycie słowa „transgeniczných” jest nieuprawnione. Nie ma również informacji o następnych pokoleniach generatywnych wyselekcjonowanych roślin. Czy badania prowadzono na wyselekcjonowanych roślinach T₀ z niepotwierdzoną transgenicznością?

Ponadto, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie dlaczego kiełkowanie nasion prowadzono w warunkach długiego dnia a nie w ciemności, jak to jest w warunkach naturalnych?

Jak uzyskano korzenie dwutygodniowe – w celu izolacji RNA do amplifikacji *HvMADS27*? Na jakiej podstawie określono stężenie NH₄NO₃ czy też CuSO₄ w celu zastosowania stresu azotu lub miedzi (10-krotność to bardzo dużo) czy też 2 tygodniowego stresu światła? Czy odniesiono ten stres do występującego czasem w środowisku?

Rozdział materiałów od metod utrudnia nieco ocenę opisu metody ponieważ czytający musi sięgać do danych (plazmidy, roztwory, pożywki itp.) zamieszczonych w materiałach a odnośników brak. Wnikliwemu czytelnikowi brakuje niektórych danych, np. nazwy pożywki używanej w konkretnej metodzie czy urządzenia do przeprowadzenia konkretnego doświadczenia (np. przy przeprowadzaniu transferu RNA na membranę nitrocelulozową).

Najważniejsze uzyskane wyniki

Przeprowadzono szczegółową analizę genów *HvMADS27* oraz *MIR444c*. W obu wypadkach zamplikowano pełną ich długość i scharakteryzowano ich budowę i ekspresję, głównie w

rozwijających się korzeniach. Następnie Doktorantka przeanalizowała bazy danych poszukując motywów regulatorowych cis związanych z odpowiedzią na stresy abiotyczne w promotorach badanych genów. Zidentyfikowała trzy grupy motywów związane ze stresem azotowym, miedzią i światłem. Mimo to, jedynie stres nadmiaru azotu spowodował zmiany w poziomie (znaczące obniżenie) mRNA *HvMADS27* w korzeniach roślin.

W dalszej części do analizy fenotypu korzeni Doktorantka zastosowała „linie transgeniczne” charakteryzujące się obniżonym poziomem ekspresji lub nadekspresją *HvMADS27*. Znacznie krótsze korzenie zaobserwowano w liniach z obniżonym poziomem ekspresji genu jak i liniach kontrolnych (WT) oraz w obu typach badanych linii transgenicznych pod wpływem stresu nadmiaru azotu. We wszystkich wypadkach nadmiar azotu korelował z obniżonym poziomem mRNA *HvMADS27*. Linie z nadekspresją *HvMADS27*, mimo braku obniżenia poziomu transkryptu wykazywały niższy poziom badanego białka Myc.

W dalszych badaniach mechanizm skracania korzeni powiązano z gospodarką azotową oraz ścieżkami sygnalizacji kwasu abscysynowego (ABA). Wykazano dominującą rolę *HvMADS27* w kontrolowaniu ilości ABA w korzeniach oraz zbieżność zawartości azotu z wzorem ekspresji mRNA transportera azotowego NRT1.1. Na podstawie analizy transkryptomu korzeni linii kontrolnej oraz linii transgenicznej *hvmads27 kd* zidentyfikowano i wybrano 6 genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny *HvMADS27*, po czym przeprowadzono weryfikację wiązania *HvMADS27* z odpowiednimi motywami regionów promotorowych tych genów. Wykazano, że *HvMADS27* odgrywa rolę represora transkrypcji genu *HvBGL1*, kodującego β -glukozydazę. Ponadto badając poziom ABA w liniach kontrolnych oraz liniach transgenicznych poddanych stresowi nadmiaru azotu wywnioskowano, że akumulacja ABA może wynikać z mobilizacji nieaktywnych zapasów koniugatu ABA z glukozą.

W wynikach nie opisano efektów procesu transformacji (potwierdzenie wbudowania transgenu w roślinach, wydajność, zakres poziomu zmian ekspresji itp.) oraz wyprowadzenia linii transgenicznych. Brakuje też informacji w jakim pokoleniu generatywnym były badane linie transgeniczne; czy były to już homo- czy też hemizygoty; jak stabilny był poziom ekspresji w osobnikach danej linii. Jeżeli linie transgeniczne nie były wyprowadzone przez Doktorantkę, nie umniejsza to wartości doktoratu, bo jest to odrębna bardzo duża praca. Takie informacje są jednak bardzo ważne i powinny się znaleźć w dysertacji.

Czy powtórzenia w analizie ekspresji dotyczą powtórzeń technicznych czy też biologicznych lub jednych i drugich? Ile było powtórzeń? Najstarsze badane korzenie miały prawie 10 tygodni. Czy rośliny rosnące w perlicie tak długo rozwijały się prawidłowo?

Dyskusję wyników przeprowadzono poprawnie, choć odniesienia literaturowe są dosyć rzadkie. Częściowo wynika to z nowości przedstawionych wyników ale częściowo również z niezbyt dokładnego prześledzenia najnowszej i starszej literatury, mimo że pozycji literatury jest dosyć dużo (około 90). Dwa rysunki uzupełniające wyniki a zamieszczone w dyskusji można było przedstawić i opisać w wynikach i przedyskutować w dyskusji. Natomiast dyskusję można było uzupełnić o omówienie mechanizmu ABA-zależnej regulacji długości i morfologii korzeni jęczmienia z udziałem badanych genów, co zostało zrobione w wynikach.

Najważniejsze osiągnięcia

Za najważniejsze osiągnięcie uważam zaproponowanie mechanizmu regulacji architektury korzenia jęczmienia w stresie nadmiaru azotu. Zgodnie z nim obniżona pod wpływem nadmiaru azotu ekspresja *HvMADS27* a co za tym idzie mniejsza liczba cząsteczek białka *HvMADS27* uwalnia blokadę promotora genu *HvBG1* powodując aktywację kodowanego przez ten gen enzymu β -glukozydazy i uwolnienie ABA z konjugatu z glukozą. Wysokie stężenie ABA w korzeniach powoduje ich skrócenie. Wykazano również, że w procesie tym jest aktywowany transporter azotu NRT1.1, zapewniając napływ azotu do korzenia.

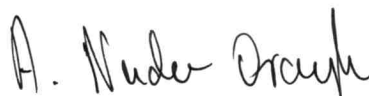
Komentarze, pytania i uwagi krytyczne zamieszczono w kolejnych częściach recenzji powyżej.

Podsumowanie oceny

Doktorantka zrealizowała bardzo obszerną i pełną pracę doświadczalną, która pozwoliła jej na zaproponowanie mechanizmu regulacji architektury korzenia jęczmienia w stresie nadmiaru azotu. Badania przeprowadzono w sposób przemyślany, biorąc pod uwagę szeroki wachlarz zarówno odpowiedniego materiału roślinnego jak i zastosowanie bogatego warsztatu eksperymentalnego. Te przesłanki umożliwiają publikację badań w czasopiśmie z wysokim IF. Warto również podkreślić, że część metod czy też wyników, głównie związanych z microRNA, zostało opublikowane z udziałem Doktorantki we wcześniejszych pracach. Moje uwagi krytyczne koncentrują się głównie na braku istotnych elementów w opisie pracy i niedoskonałościach językowych (nazewnictwo, stosowanie skrótów). Mimo, że są one mniej istotne i możliwe do poprawienia przy redagowaniu następnych prac, jednak niepotrzebnie zaniżają ocenę tych bardzo wartościowych badań.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Z powyższych względów wnoszę

do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu **o dopuszczenie mgr Aleksandry Smoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego** o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biotechnologia.



Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk