

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed
80-822 Gdańsk, ul. Kładki 24; tel.: +48 58 5236345, faks: +48 58 5236430

Gdańsk, dnia 7 marca 2019

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin
Katedra Biotechnologii
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Abrahama 58, 80-307 Gdańsk

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Irminy Wyrzykowskiej
zatytułowanej „Rola czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65, MYB101
w odpowiedzi roślin na niedobór wody”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Irminy Wyrzykowskiej, została wykonana pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej w Zakładzie Ekspresji Genów Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Przedmiotem badań było poznanie wpływu czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65, MYB101 na tolerancję roślin *Arabidopsis thaliana* i *Solanum tuberosum* na niedobór wody.

Rośliny, tak rosnące w naturalnym środowisku jak i uprawiane przez człowieka są narażone na stres abiotyczny, np. deficyt wody, niską, wysoką temperaturę, zasolenie gleby i biotyczny, np. wirusy, bakterie, grzyby czy szkodniki. Ocenia się, że globalne straty plonów roślin spowodowane przez wymienione czynniki sięgają około 30%. Jest to szczególnie istotne w obliczu szybko wzrastającej liczby ludzi i związanego z tym coraz większego zapotrzebowania na żywność. Susza i niedobór wody są najważniejszymi czynnikami stresogennymi limitującymi zasięg upraw i wysokość uzyskiwanych plonów. Stąd postawione w recenzowanej rozprawie pytanie o czynniki, które mogą regulować tolerancję roślin na niedobór wody uważam za bardzo ważne. Wcześniejsze prace zespołu prof. Szweykowskiej-Kulińskiej, polegające na wyciszeniu ekspresji genu kodującego białko CBP80/ABHI doprowadziły do uzyskania roślin *Arabidopsis* i

ziemniaka o podwyższonej tolerancji na stres wodny. Wskazano równocześnie, iż rośliny te charakteryzowały się większą wrażliwością na kwas abscysynowy (ABA) i szybciej w warunkach niedoboru wody zamykały aparaty szparkowe. Ponieważ białko CBP80/ABH1 wiąże się do struktury capu różnych transkryptów polimerazy II i bierze udział w regulacji dojrzewania pre-mRNA i pri-mRNA, brak ekspresji genu który je koduje ma efekt pleiotropowy na wzrost i rozwój roślin.

Celem recenzowanej pracy było zatem poszukiwanie regulatorów „niższego rzędu”, bardziej wyspecjalizowanych i wpływających na tolerancję niedoboru wody bez wpływu na fizjologię badanych roślin. Postawiono hipotezę, iż funkcję taką mogą pełnić czynniki transkrypcyjne MYB33, MYB65 i MYB101, których poziom jest regulowany przez poziom mikroRNA159 i obecność lub brak białka CBP80/ABH1. Zaplanowano zatem badania, które miały na celu określenie funkcji czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65, MYB101, których poziom jest regulowany przez białko CBP80/ABH1 zaangażowane w szlak transdukcji sygnału ABA w odpowiedzi rośliny modelowej *A. thaliana* i użytkowej *S. tuberosum* na stres suszy.

Na pierwszym etapie studiów stwierdzono, iż obniżona ekspresja genów kodujących czynniki MYB33, MYB65, MYB101 (wykorzystano do tych badań linie mutantów pozyskane z bazy Salk Institute) nie wpływa na morfologię, anatomię i procesy rozwojowe Arabidopsis. Uzyskane mutanty miały natomiast obniżoną tolerancję na stres suszy w porównaniu do roślin typu dzikiego (Arabidopsis, ekotyp Col-1) a ich aparaty szparkowe były niewrażliwe na ABA. Postanowiono zatem skonstruować rośliny transgeniczne z podwyższoną ekspresją genów kodujących wymienione czynniki transkrypcyjne i w kolejnym etapie sprawdzić ich tolerancję na stres niedoboru wody. Założono przy tym, że nadekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne MYB33, MYB65, MYB101 w roślinach Arabidopsis, podobnie jak ich zbadana wcześniej obniżona ekspresja, nie będzie wpływać na morfologię i cechy fizjologiczne uzyskanych mutantów. Uzyskano mutanty Arabidopsis z nadekspresją genów kodujących czynniki MYB33, MYB65, MYB101 pochodzących z Arabidopsis oraz kolejne wykazujące nadekspresję genów kodujących MYB33, MYB65 pochodzących z ziemniaka. Obserwacje mutantów i ich porównanie z roślinami typu dzikiego potwierdziły zdaniem doktorantki tezę, iż zmiana poziomu czynników transkrypcyjnych MYB33, MYB65, MYB101 nie wpływa istotnie na morfologię i fizjologię roślin Arabidopsis.

Bardzo ważnym elementem zaplanowanych i zrealizowanych badań było skonstruowanie mutantów roślin ziemniaka - jednej z najważniejszych roślin użytkowych a przy tym stosunkowo wrażliwej na stres niedoboru wody - z nadekspresją genów kodujących wymienione czynniki transkrypcyjne, podwyższające tolerancję roślin *Arabidopsis* na niedobór wody. W przypadku ziemniaka uzyskano linie odmiany Desiree z nadekspresją genów kodujących MYB33, MYB65 i MYB101 pochodzących z *Arabidopsis* oraz genów kodujących MYB33, MYB65 pochodzących z ziemniaka. Uzyskane mutanty ziemniaka, podobnie jak wcześniej zbadane rośliny *Arabidopsis* nie wykazywały znaczących różnic morfologicznych, anatomicznych i rozwojowych w porównaniu z liniami dzikimi. Wykazywały natomiast, zgodnie z postawioną hipotezę, podwyższoną tolerancję na kilkudniowy niedobór wody.

Rozprawa doktorska ma typową strukturę i składa się z wstępu będącego przeglądem literatury, opisu wykorzystywanych materiałów i zastosowanych metod, analizy uzyskanych wyników, dyskusji i spisu literatury. Rozprawa zawiera także dobrze sprecyzowany cel pracy, spis zastosowanych skrótów oraz krótki akapit zawierający wnioski i perspektywy dalszych badań. Trochę dziwne jest usytuowanie spisu treści na końcu rozprawy a nie na jej wstępie.

Przegląd literatury przedmiotu jest napisany zwięzłym i jasnym językiem ale został ograniczony do rozdziałów dotyczących krótkiej charakterystyki gatunków będących przedmiotem badań oraz omówienia szlaków sygnalizacyjnych ABA, roli tego hormonu w odporności roślin na suszę i omówieniu roli białek regulatorowych i czynników transkrypcyjnych w przenoszeniu sygnału wywołanego obecnością lub brakiem obecności ABA. W moim odczuciu wstęp powinien zawierać także rozdział na temat metod stosowanych do uzyskiwania mutantów i konstruktów wykorzystywanych do transformacji roślin oraz opis metod pozwalających na weryfikację obecności transgenu, transkryptu i kodowanego przez nie białka w potencjalnych liniach transgenicznym. Warto byłoby także napisać o metodach i potrzebie badania homozygotyczności komercyjnie dostępnych i konstruowanych samodzielnie mutantów *Arabidopsis*.

Materiały i metody wykorzystywane w badaniach stanowiących podstawę rozprawy zostały opisane wyczerpująco i z dobrą znajomością zastosowanych narzędzi badawczych.

Rozdział **Wyniki** jest starannie przygotowany i zaopatrzony w dobrą dokumentację graficzną. Muszę jednak przyznać, iż czytając rozprawę i przyglądając się fotografiom linii dzikich i mutantów mogłam zaobserwować, iż niektóre z nich charakteryzują się nietypowymi, lancetowato wydłużonymi liśćmi (np. mutant MYBA65 OE3-1 na Rys/Fot. 22, czy MYB S33OE

3-52 na Rys/Fot 24 inne wykazują słabą chlorozę). Ponieważ doktorantka podkreśla w rozprawie, iż mutanty nie różniły się morfologią i fizjologią od roślin dzikich chciałabym się dowiedzieć dlaczego nie omówiono/przedyskutowano tego zjawiska w rozprawie. Być może moje wątpliwości co do różnic w morfologii roślin przedstawionych na fotografiach wiązały się z nienajlepszą jakością tych fotografii. Dodatkowo brak na nich zaznaczonej skali a wygląda na to, iż fotografie były wykonywane z różnych odległości.

Moje kolejne pytanie dotyczy badań wzrostu i rozwoju roślin dzikich i mutantów. Czy poza przedstawionymi w pracy porównano także inne parametry, jak na przykład: tempo przyrostu masy zielonej, czas kwitnienia, czas wytwarzania łuszczyń?

Dokładne zapoznanie się z wynikami zaprezentowanymi na rysunkach 10, 11 i 12 nasunęło mi pytanie o różnice w względnej zawartości wody w tkankach roślin dzikich w doświadczeniach z mutantami wykazującymi obniżoną ekspresję genów kodujących czynniki MYB33, MYB65 i MYB 101: wartości względnej zawartości wody dla WT od 0,8 do 0,9 (Rys. 10,11,12) i w tkankach roślin dzikich w doświadczeniach z mutantami wykazującymi nadekspresję genów kodujących czynniki MYB33, MYB65 i MYB 101: wartości względnej zawartości wody dla WT od 0,65 do 0,4; (Rys. 21, 22, 23) po 6 dniach niedoboru wody. Podobne wątpliwości nasuwają wartości apertury aparatów szparkowych przedstawione dla roślin dzikich w doświadczeniach z mutantami wykazującymi obniżoną ekspresję badanych czynników transkrypcyjnych: wartość około 0,5 przy stężeniu ABA 5mM (Rys. 17) i dla roślin dzikich w doświadczeniach z mutantami wykazującymi nadekspresję badanych czynników transkrypcyjnych: wartość około 0,7 przy stężeniu ABA 5mM (Rys. 30). Jak rozumiem z opisu materiałów i metod w obu grupach doświadczeń wykorzystywana była ta sama linia dzika linia *Arabidopsis*. Sądzę, że sytuacja byłaby jaśniejsza gdyby do doświadczeń z mutantami z nadekspresją czynników MYB33, MYB65 i MYB 101 włączyć mutanty z wyłączoną ekspresją genów kodujących te czynniki; czyli porównać oceniane parametry we wszystkich badanych liniach w jednym doświadczeniu. W związku z takim a nie innym przedstawieniem wyników badań proszę doktorantkę o skomentowanie różnych wartości względnej zawartości wody i wartości apertury aparatów szparkowych w linii dzikiej w dwóch wymienionych powyżej seriach doświadczeń. **Dyskusja** uzyskanych wyników nie jest zbyt obszerna ale omawia w świetle dostępnej literatury wyniki uzyskanych badań i ich znaczenie naukowe.

W recenzowanej pracy zauważyłam nieliczne błędy edytorskie. Wymienię tylko najważniejsze. W przypadku rozdziału Wyniki na Rys. 17ABC, który dokumentuje wyniki badań

nad zamykaniem się szparek pod wpływem ABA na osi rzędnych napisano: „Względna zawartość wody” a powinno być „Apertura aparatów szparkowych”. Rozdział Wnioski i perspektywy zakończono dość niefortunnym zdaniem „Także dotarcie do wyjaśnienia dlaczego problematyczne było uzyskanie roślin Arabidopsis i ziemniaka z nadekspresją genu S.tubMYV65 pozwoliłoby zrozumieć na czym polega silna toksyczność dawki tego genu”.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa zawiera cenne wyniki, a ich analiza pozwala na stwierdzenie, że doktorantka osiągnęła założone cele. Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest dobrym językiem, wyniki badań są dobrze udokumentowane, a całość reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy ukierunkowany na wykorzystanie wiedzy na temat molekularnych czynników warunkujących wyższą tolerancję roślin uprawnych na niekorzystne czynniki środowiskowe. Jest to tym bardziej cenne, iż badania przeprowadzono na roślinie modelowej i użytkowej – ziemniaku. Uzyskane wyniki zostaną zapewne wkrótce opublikowane w postaci artykułu w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Oceniana praca dokumentuje opanowany przez Panią magister warsztat naukowy, który umożliwia obecnie i w przyszłości prowadzenie ważnych, poznawczych i aplikacyjnych badań związanych z szerokim zastosowaniem metod biologii molekularnej, inżynierii genetycznej, mikrobiologii a także fizjologii roślin. Poznane techniki badawcze powinny jej pozwolić na kontynuację pracy zawodowej w różnych kierunkach.

Wnioski końcowe

***W świetle przedstawionej powyżej, pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej
magister Anny Irminy Wyrzykowskiej wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama
Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.***

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat możliwości regulacji adaptacji roślin do warunków niedoboru wody. Uważam, że oceniana praca spełnia wszystkie wymogi formalne, zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.), stawiane rozprawom doktorskim. Szkoda, że przedstawione w rozprawie wyniki nie zostały dotychczas opublikowane i przedstawione szerszym kręgom naukowców pod dyskusję.



