

Dr hab. Maciej T. Grzesiak
Polska Akademia Nauk
Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego*
ul. Niezapominajek 21
30-239 Kraków

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Fiust nt:

„Markery genetyczne mrozoodporności i tolerancji na suszę u jęczmienia”

Praca doktorska pani mgr inż. Anny Fiust została przedstawiona do recenzji w formie manuskryptu obejmującego 182 strony i zawiera 30 tabel oraz 16 rycin. Cytowanych jest około 350 pozycji literatury i są to przede wszystkim oryginalne publikacje głównie anglojęzyczne oraz prace przeglądowe i podręczniki akademickie. Pod względem edytorskim manuskrypt pracy został bardzo starannie opracowany, co wskazuje m.in. na dobrą znajomość programów edytorskich. Tekst pracy podzielono na rozdziały zgodnie z przyjętą dla dysertacji doktorskich strukturą tekstu tj. przegląd literatury, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis literatury oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Autorka wykonała pracę w Katedrze Fizjologii Roślin Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego *im. Hugona Kollątaja* w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Rapacza, a promotorem pomocniczym była dr Madgalena Wójcik-Jagła. W przeprowadzonych doświadczeniach Autorka w pełni wykorzystwała możliwości warsztatu badawczego jakie miała do dyspozycji, a w tym przede wszystkim dostęp do nowoczesnych i powszechnie stosowanych metod badawczych porównywalnych z metodami stosowanymi w badaniach prowadzonych w laboratoriach zagranicznych oraz dostęp do nowoczesnej aparatury o światowym standardzie, co niewątpliwie miało wpływ na rzetelność uzyskanych wyników. Niewątpliwie dobrą podstawą do sformułowania tematu pracy i celów badawczych był fakt, że badania były wykonane w zespole o wysokiej pozycji zarówno w krajowym jak i europejskim środowisku naukowym. Doświadczenia były wykonywane w klimatyzowanych szklarniach i komorach wzrostowych fitotronu Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, w których była możliwość kontrolowania, programowania i monitorowania wszystkich ważnych parametrów klimatycznych oraz w tunelu ogrodniczym. Praca doktorska mgr inż. Anny Fiust wykonana została w ramach projektu „Innowacyjny system selekcji jęczmienia i pszenżyta w oparciu o osiągnięcia fenomiki i genomiki–Genmark” realizowanego w ramach Programu Badań Stosowanych finansowanych przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (PBS1/A8/1/2012). Badania były również współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu PRELUDIUM (2013/09/N/NZ9/01588) oraz przy udziale środków pochodzących z projektu „Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej.

Wzrost ilości i jakości plonu roślin uprawnych będzie możliwy przez „postęp biologiczny” w rolnictwie, gdyż możliwości poprzez zwiększenie nakładów na uprawę, nawożenie i ochronę roślin są ograniczone. Ten cel może być osiągnięty poprzez wprowadzenie nowych odmian charakteryzujących się m.in. zwiększoną tolerancją na stropy środowiskowe. Klimatyczne anomalie występują obecnie częściej i przejawiają się m.in. wzrostem średniej temperatury oraz wahaniami wielkości i dystrybucji opadów, a to powoduje, że niekorzystne dla środowiska skutki ekologiczne, a dla gospodarki znaczące straty ekonomiczne. W Polsce często mamy do czynienia z występowaniem suszy oraz okresami niskich mrozowych temperatur, które obejmują znaczne obszary upraw. Te fakty oraz ograniczanie terenów rolniczo użytecznych i wzrost kosztów produkcji stymulują potrzebę badań podstawowych, które mogą zapobiegać kryzysowi żywnościowemu. Temat pracy doktorskiej mieści się w zakresie biologii molekularnej, która w ostatnich latach przeżywa bardzo szybki rozwój oraz w naukach biologicznych, medycynie i rolnictwie. Nie sprawdziły się przewidywania profesora Gunthera Stenta z Uniwersytetu w Berkeley, który w latach sześćdziesiątych XX wieku wyrażał pogląd, że w związku z poznaniem podstawowych problemów dziedziczenia i kodu genetycznego biologia molekularna nie będzie miała większego znaczenia, bo materiał genetyczny jest „statyczny” i że mogą w nim

zachodzić zmiany dające się przewidzieć w mutacjach i rekombinacjach. Ten pogląd został jednak szybko zweryfikowany w momencie odkrycia plazmidów, co stwarzało nowe możliwości manipulowania i konstruowania genomu. Od tego czasu biologia molekularna jest jedną z najszybciej rozwijających dyscyplin, a liczba informacji dotycząca słów kluczowych i zrealizowanych lub realizowanych na świecie projektów badawczych wg. Web of Science wynosi kilkadziesiąt tysięcy. Klasyczne metody selekcji w kierunku zwiększenia odporności na suszę i niskie temperatury są często mało skuteczne wobec poligenicznego modelu dziedziczenia, a alternatywnym rozwiązaniem dla niej jest wykorzystanie metod molekularnych. W badaniach Autorka wykorzystwała markery fizjologiczne i molekularne. Markery fizjologiczne wspomagają selekcję roślin posiadających poszukiwane cechy, jest to jednak zadanie pracochłonne i czasochłonne, wymaga wielu doświadczeń, uwzględnianie różnych faz wzrostu i rozwoju roślin oraz powtarzalnych warunków środowiska. Natomiast markery molekularne są bardziej uniwersalne, gdyż nie ulegają modyfikacji pod wpływem czynników środowiska, a selekcja jest niezależna od fazy rozwojowej rośliny.

Uwagi szczegółowe

W rozdziale zatytułowanym „Przegląd literatury” Autorka przedstawia problematykę podjętych badań. W tym rozdziale pracy Autorka zamieszcza informacje dotyczące:

- botanicznych i rolniczych cech wybranego do badań gatunku *Hordeum vulgare L.*
- fizjologicznych i molekularnych podstaw wrażliwości na stresy suszy i mrozoodporności
- molekularnych markerów selekcji (MAS, SSR, DArT) jako alternatywy dla konwencjonalnych metod selekcji
- mapowania asocjacyjnego jako narzędzia do wyznaczania zależności pomiędzy markerem i cechą
- bioinformatycznych sposobów analizy sekwencji genomowych
- ilościowej oceny poziomu ekspresji genów techniką Real-Time PCR

Cytowana w tym rozdziale literatura wskazuje na dobrą znajomość problematyki badawczej prowadzonych przez krajowe i zagraniczne ośrodki naukowe. Lektura tego rozdziału wskazuje na usytuowanie podjętej tematyki badawczej w aktualnym stanie wiedzy oraz potwierdza słuszność podjęcia tych badań. Autorka zwraca również uwagę na problemy, które obecnie nie są w pełni poznane i wyjaśnione. Lektura tego rozdziału pozwala czytelnikowi wyrobić sobie opinię co do słuszności podjęcia badań i ich usytuowanie w aktualnym stanie wiedzy.

W rozdział zatytułowanym "Cel pracy" Autorka przedstawia główne założenia podjętej tematyki, które koncentrowały się:

- na opracowaniu skutecznych molekularnych wskaźników przeznaczonych do praktycznego wykorzystania w selekcji jęczmienia jarego o zwiększonej odporności na stresy suszy glebowej i mrozoodporności
- zagęszczenie rejonów QTL dla cech fizjologicznych związanych z odpornością na suszę u polskich genotypów jęczmienia jarego na podstawie nowych wskaźników wyznaczonych na podstawie zależności wskaźnik-cecha
- identyfikacji charakterystyki i oceny poziomu ekspresji potencjalnych genów mrozoodporności przeprowadzonej na podstawie sekwencji markerów DArT dla parametrów mrozoodporności.

Głównym celem badań była identyfikacja systemów markerowych przeznaczonych do praktycznego wykorzystania w selekcji roślin jęczmienia jarego o zwiększonej odporności na stres suszy glebowej oraz jęczmienia ozimego o zwiększonej odporności na stres niskich (mrozowych) temperatur.

W rozdziale „Materiał i Metody” Autorka podaje informacje dotyczące doświadczeń tj. badań wstępnych, materiału roślinnego, schematów doświadczeń i badanych obiektów a także warunków wzrostu roślin, oceny fenotypowej reakcji roślin poddanych działaniu suszy i niskich temperatur oraz stosownych laboratoryjnych fizjologicznych wskaźników wrażliwości na badane stresy. W przeprowadzonych doświadczeniach materiałem roślinnym była odmiana, zaawansowane rody oraz linie DH i SSD. Wykorzystano populacje 1214 genotypów jęczmienia jarego i 142 genotypów jęczmienia ozimego dostarczane przez firmy hodowlane w ramach projektu „GENMARK”.

Następnie szczegółowo i starannie przedstawia metodykę stosowaną do analizy profilu genetycznego markerów molekularnych, izolacji roślinnego DNA, analizy polimorfizmu markerów STS i SSR, mapowania asocjacyjnego parametrów wrażliwości na suszę jęczmienia jarego, bioinformatycznej analizy sekwencji wybranych markerów DArT tolerancji suszy i mrozoodporności jęczmienia, analizy poziomu ekspresji genów kandydatów mrozoodporności jęczmienia, wyboru genów referencyjnych i metody Real-Time PCR. Autorka w tym rozdziale szczegółowo podaje informacje o wykorzystanej aparaturze i stosowanych odczynnikach. Na zakończenie tego rozdziału Autorka omawia wykorzystane metody statystyczne wykorzystane przy opracowaniu wyników pomiarów i analiz.

Rozdział „Wyniki” Autorka podzieliła na 5 podrozdziałów, w których omawia:

- molekularne markery wrażliwości na stres suszy jęczmienia jarego poprzez analizę polimorfizmu markerów molekularnych i ich korelacje z rolniczymi i fizjologicznymi wskaźnikami wrażliwości na suszę glebową.
- genotypowanie materiałów roślinnych metodą DArTseq i zagęszczanie rejonów genomowych jęczmienia jarego markerami uzyskanymi w wyniku mapowania asocjacyjnego
- analizę polimorfizmu markerów mrozoodporności jęczmienia
- identyfikację genów tolerancji na podstawie sekwencji markerów DArT
- bioinformatyczną charakterystykę markerów tolerancji suszy jęczmienia jarego
- identyfikacji genów zimotrwałości jęczmienia ozimego w oparciu o sekwencje markerów DArT
- ocenę aktywności genów kandydujących o zróżnicowanym stopniu wrażliwości na niskie temperatury.

W rozdziale „Wyniki” Autorka wykazała, że założony cel badań był konsekwentnie realizowany. W kolejnych podrozdziałach prezentuje uzyskane wyniki obserwacji i pomiarów w doświadczeniach polowych i szklarniowych. Autorka wykazała, że tolerancja jęczmienia jarego na stres suszy glebowej lub jęczmienia ozimego na działanie niskich mrozowych temperatur jest ważnym zagadnieniem naukowym dla fizjologów i hodowców, a ze względu na rolnicze znaczenie tego gatunku stanowi istotny problem ekonomiczny. Ze względu na swoją biologię jęczmień jest interesującym obiektem badawczym charakteryzującym się dużą genotypową i fenotypową zmiennością.

W prezentowanej w pracy wykorzystano analizę polimorfizmu markerów molekularnych techniką PCR po ich konwersji z systemem DArT. Uzyskane wyniki oznaczeń genotypowych korelowano z wynikami oceny fenotypowej roślin jęczmienia przeprowadzonej na podstawie laboratoryjnych testów wrażliwości na mrozoodporność i suszę. Dla fenotypowej charakterystyki badanych genotypów wykorzystano wyniki doświadczeń polowych z trzech sezonów wegetacyjnych prowadzonych niezależnie przez firmy hodowlane.

Wykonana w badaniach analiza 19 polimorficznych loci sprzężonych z tolerancją na stres suszy pozwoliła na wskazanie zestawu trzech markerów DArT: bPb-6721, bPb-6450 i bPb-1312 przydatnych w selekcji jęczmienia o zwiększonej tolerancji na ten stres. Ponadto, wykazano istotne korelacje obecności trzech markerów: bPb-6721, bPb-6399 i bPb-7786 z odpornością na choroby jęczmienia jarego powszechnie limitujące plon jęczmienia. Szczególną przydatność w selekcji roślin o wysokim potencjale plonotwórczym w warunkach suszy wykazano dla markera bPb-7786. W badaniach opracowano również zestaw trzech markerów mrozoodporności jęczmienia ozimego: bPb-1593, bPb-7975 i bPb-1815, które mogą być wykorzystywane w programach hodowlanych w celu identyfikacji genotypów o wysokiej mrozoodporności. Potwierdzono przydatność dwóch markerów DArT w eliminacji osobników wrażliwych na stres mrozu. Przeprowadzono także próbę zagęszczenia rejonów QTL dla cech fizjologicznych związanych z tolerancją suszy u polskich genotypów jęczmienia jarego nowymi markerami wyznaczonymi na podstawie asocjacji marker-cecha. Zidentyfikowano 16 nowych markerów DArTseq i 19 SNP istotnie asocjowanych z parametrami tolerancji suszy, które wykorzystano do zagęszczenia 5 rejonów chromosomowych jęczmienia: 2H, 3H, 4H, 5H i 6H. W badaniach przeprowadzono bioinformatyczną analizę sekwencji markerów DArT dla parametrów mrozoodporności jęczmienia ozimego w kontekście ich podobieństwa do genów potencjalnie zaangażowanych w kształtowanie różnic w odporności na mróz. Przeprowadzona analiza poziomu ekspresji proponowanych sekwencji u czterech genotypów o skrajnie zróżnicowanej

mrozooporności, pozwoliła na wskazania trzech, dotychczas niezidentyfikowanych u jęczmienia genów: *ATPase*, *DDMI* i *BIG*, jako kandydujących na geny związane z mrozoopornością.

Treść prezentowaną w rozdziale „Dyskusja” Autorka ukierunkowała na relacje pomiędzy uzyskanymi wynikami a aktualnym stanem wiedzy dotyczącym badanych zagadnień tj.

- molekularnych markerów tolerancji na stres suszy u jęczmienia jarego oraz stres mrozooporności u jęczmienia ozimego
- zagęszczanie rejonów loci cech ilościowych związanych z genetycznie uwarunkowaną wrażliwością jęczmienia jarego na stres suszy glebowej
- bioinformatycznej analizie sekwencji DArT jako źródło informacji o potencjalnych genach i wykorzystania markerów DArT w identyfikacji genów mrozooporności u jęczmienia ozimego.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań zostały podsumowane w postaci pięciu dobrze udokumentowanych wniosków. Przy sformułowaniu wniosków Autorka wykazała zarówno krytycyzm jak i należyłą ostrożność. Wydaje się, że przy przygotowaniu publikacji konieczne będzie uzupełnienie dyskusji o bardziej szczegółowe rozpatrzenie tych zagadnień które obecnie nie są jeszcze w pełni poznane i wyjaśnione jak również do ustosunkowania się do rozwiązań alternatywnych i wymagających dalszych badań. Przypuszczam, że ze względu na wnioski aplikacyjne praca wzbudzi zainteresowanie praktyków i zasługuje na promocję w środowiskach zajmujących się praktyczną hodowlą jęczmienia. W załączonym spisie literatury Autorka uwzględniła około 350 pozycji. Obok autorów zagranicznych Autorka cytuje prace autorów polskich co wskazuje na zainteresowanie tymi zagadnieniami w krajowych ośrodkach badawczych.

Mam drobną uwagę dotyczącą stosowanej przez Autora nomenklatury dotyczącej stanu uwodnienia opartego o metody wagowe tj. oznaczania świeżej (F_m), suchej (D_m) masy i masy w stanie całkowitej turgorescencji (T_m). Wg klasycznej definicji WC (water content) jest różnicą pomiędzy świeżą a suchą masą, a jednostką są gramy H_2O . Natomiast RWC (relative water content) jest stosunkiem różnicy pomiędzy świeżą a suchą masą (licznik), w mianowniku najczęściej świeża masa, a czasami sucha masa, niektórzy także do mianownika wstawiają powierzchnię. To co Autorka przyjmuje za RWC to tak naprawdę jest RT (relative turgidity). Licznik RT jest identyczny jak w przypadku RWC natomiast w mianowniku zamiast świeżej masy (F_m) jest masa w stanie pełnego turgoru (T_m). Metodę oznaczania RT opracował P. E. Weatherley w latach pięćdziesiątych XX wieku. RT jest wskaźnikiem fizjologicznie bardziej obiektywnym niż RWC, gdyż informuje o potencjalnych możliwościach tkanki do wysycenia wodą. Wg. klasycznej metody oznaczenie T_m uzyskiwano po umieszczeniu na 24 godziny tkanki w wodzie w temperaturze $+4^0 C$ (w tej temperaturze woda ma największą gęstość) oraz przy słabym oświetleniu. Należy również wskazać, że odwrotnością RT jest WD (water deficit), który informuje w jakim stopniu potencjalne możliwości tkanki odbiegają od stanu aktualnego. H. D. Barrs w I tomie monografii Kozłowskiego (Water Deficit and Plant Growth) zamieścił artykuł przeglądowy, w którym krytycznie ocenił różne wskaźniki uwodnienia określane metodami wagowymi. Między innymi wykazał, że dla oznaczenia T_m okres 24 godzin umieszczenie tkanki w wodzie nie jest całkiem prawidłowy, gdyż najwyższą wartość T_m tkanka uzyskuje wcześniej, a w następnej fazie część pobranej wody wraca do roztworu. Osobiście jestem zdziwiony „zaniknięciem” wskaźnika RT, a zamiast jego autorzy stosują dwa różne i odmiennie wskaźniki nazywając je RWC a to może i jest powodem odmiennych konkluzji.

Podsumowanie recenzji

Manuskrypt pracy doktorskiej mgr inż. Anny Fiust został pod względem edytorskim poprawnie i starannie opracowany. Autorka w wykorzystaniu dostępnych programów komputerowych umożliwiających redakcyjną prezentację wykresów, tabel. Dołączona dokumentacja, którą Autorka prezentuje w formie dobrze przygotowanych tabel i wykresów jest starannie opracowana. Strona opisowa jest przejrzysta, a stosowane w badaniach metody statystyczne prawidłowe. Prawdopodobnie ze względu na wielowątkowość omawianych zagadnień nie całkowicie udało się Autorce uniknąć powtórzeń fragmentów, które były rozpatrywane w różnych miejscach rozdziałów "Wstęp" i "Dyskusja". Uwagi dotyczące problemów redakcyjnych dostrzeżone w manuskrypcie zaznaczyłem w

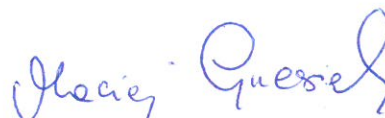
tekście do ewentualnego wykorzystania przy opracowaniu tekstu do publikacji w czasopiśmie naukowych.

W mojej ocenie przedstawiony manuskrypt pod względem formalnym i merytorycznym spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Rozprawa doktorska pani mgr inż. Anny Fiust wnosi nowe elementy poznawcze i użyteczne wzbogacające naszą wiedzę i jest przykładem zamkniętego cyklu badawczego od koncepcji i hipotez przez staranny dobór materiału roślinnego, właściwe metody oraz przedyskutowaniu wyników własnych i ich konfrontację z poglądami innych autorów. Na podstawie załączonej do manuskryptu dokumentacji można stwierdzić, że znaczący dorobek ukazuje mgr inż. Annę Fiust jako zdolnego, samodzielnego pracownika naukowego o skrytykowanym zainteresowaniach. W Jej dotychczasowym dorobku znajdujemy oryginalne prace poznawcze, a dostępny warsztat badawczy pozwala na prowadzenie badań na poziomie nie odbiegającym od standardów europejskich. Sprzyjającą okolicznością dla dalszej naukowej działalności naukowej są kontakty nawiązane z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami badawczymi co pozwala na powiązanie tematyki badań własnych z aktualnymi trendami światowymi. Są dwie przesłanki pozwalające patrzeć z optymizmem na Jej dalszy rozwój naukowy. Po pierwsze cele skutecznej hodowli roślin tolerujących stresowe warunki środowiska są ważne i aktualne, a po drugie własnymi i oryginalnymi pomysłami wzmocni programy badawcze i hodowlane roślin.

Ze względu na duże zaangażowanie Autorki w wykonywanych badaniach oraz znaczenie uzyskanych wyników dla realizacji projektów Unii Europejskiej i Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego zwracam się z prośbą o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy doktorskiej pani mgr inż. Anny Fiust.

Podsumowując ocenę stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr inż. Anny Fiust spełnia wszystkie wymagania określone w ustawie z dnia 14 marca 2004 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. nr. 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami, stawiam wniosek do Rady Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie pani mgr inż. Anny Fiust do następnych etapów publicznej obrony.

Kraków 21 lutego 2016



(dr hab. Maciej T. Grzesiak, prof. IFR PAN)