

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Fiust**  
**pt. *Markery genetyczne mrozoodporności i tolerancji suszy u jęczmienia***  
**wykonanej w Katedrze Fizjologii Roślin Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie**  
**pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Marcina Rapacza i**  
**promotora pomocniczego dr inż. Magdaleny Wójcik-Jagły**

## **Wprowadzenie**

Programy precyzyjnej hodowli roślin w coraz większym stopniu wykorzystują markery genetyczne do selekcji określonych cech agronomicznych. Warunkiem skutecznego stosowania tego narzędzia jest dysponowanie wiarygodnymi danymi opisującymi położenie markera na mapie genetycznej i jego korelację z określoną cechą fenotypową oraz transferowalność tych danych z jednej populacji na inne. Spełnienie tych kryteriów nie jest łatwe a dodatkowo może być komplikowane wówczas, gdy: i) badane cechy są dziedziczone ilościowo, ii) charakteryzują się względnie niewielką i różną dla różnych populacji odziedziczalnością, iii) obserwowany jest duży wpływ zmiennego środowiska na efekt fenotypowania, iv) badane populacje cechuje silne zróżnicowanie genetyczne oraz v) fenotypowanie badanej cechy jest dodatkowo modyfikowane przez zmiany epigenetyczne będące efektem interakcji rośliny ze środowiskiem. Tylko ta krótka, wstępna charakterystyka obrazuje, że dziedzina, której dotyczy oceniania praca doktorska jest zarówno ważna jak i merytorycznie złożona.

## **Opis i recenzja dysertacji**

Strukturę dysertacji, liczącej 182 strony, charakteryzuje klasyczny podział na *Streszczenie*, *Przegląd literatury*, *Material i metody*, szczegółowo opisane *Wyniki* oraz interesującą *Dyskusję* uzyskanych wyników w zestawieniu z literaturą światową.

Dodatkowo Autorka zestawiała używane w pracy skróty, przedstawiła *Cel badań* oraz podsumowała wyniki w siedmiu końcowych *Wnioskach*. Całość kończy *Wykaz cytowanej literatury* obejmujący 273 pozycje.

Dysertacja napisana jest rzeczowo i komunikatywnie. Słownictwo i terminologia są poprawne a styl, w jakim napisana jest praca pozwala z przyjemnością czytać rozdziały opisowe. Cała praca jest napisana z minimalnym udziałem neologizmów oraz praktycznie bez żargonu laboratoryjnego. Przegląd literatury jest dobrym i aktualnym źródłem informacji o najważniejszych elementach pracy: badanym gatunku, stresach suszy i niskiej temperatury oraz fizjologicznych reakcjach roślin na te stresy. Część przeglądu literatury dotyczy narzędzi badawczych w tym: identyfikowania markerów genetycznych, konstruowania map genetycznych, mapowania asocjacyjnego, selekcji wspomaganą markerami oraz metod statystycznych.

Opis wyników jest podporządkowany chronologii kolejnych etapów. Na początku dysertacji Autorka zamieściła rysunek ze schematem trzech grup eksperymentów, które w kolejnych sekcjach są systematycznie opisane. Dysertacja jest kontynuacją wcześniejszych projektów. Na jej początku Autorka przedstawia wyniki wstępne, które pozwoliły jej na typowanie markerów DArT skorelowanych z loci cech ilościowych (QTL) badanych cech fenotypowych i parametrów fizjologicznych. Przy wyborze markerów będących podstawą dalszych badań uwzględniano procent wyjaśnianej zmienności oraz ich stopień addytywności. Obecność



sekwencji mikrosatelitarnych w regionach markerów lub polimorfizm sekwencji nukleotydowej umożliwiły konwersję na łatwiejsze eksperymentalnie markery SSR lub STS.

Listę tą dodatkowo wzbogacono o leżące w pobliżu markery z bazy GrainGenes. Po eksperymentalnej weryfikacji do dalszej pracy wybrano 17 (wg Tabeli 2a) najbardziej obiecujących markerów. W analogicznym postępowaniu, na podstawie wcześniejszego mapowania asocjacyjnego, wytypowano markery parametrów fluorescencji chlorofilu zasocjowane z reakcją roślin na niskie temperatury. Tutaj do dalszej weryfikacji wybrano 20 markerów (wg. Tabeli 2b). W obydwu przypadkach ważnym kryterium była silna korelacja z parametrami fizjologicznymi i parametrami fluorescencji chlorofilu.

[Które z parametrów fizjologicznych są, zdaniem Pani, najlepsze do diagnozowania reakcji rośliny za stres suszy i niskiej temperatury?](#)

Polimorfizm markerów tolerancji suszy testowano w populacji 1034 genotypów jęczmienia i wybrano te, których polimorfizm najsukuteczniej różnicował polskie genotypy jęczmienia o zróżnicowanej wrażliwości na suszę. Wybrane markery różniły się polimorfizmem w badanej populacji a najwyższy polimorfizm dla trzech grup genotypów wykazywały markery SSR: *Bmac209*, *bPb-6735* i *bPb-3908* oraz markery STS: *bPb-6721*, *bPb-0858*, *bPb-7786* i *bPb-8884*.

Do szczegółowej charakterystyki parametrów fizjologicznych w warunkach suszy wybrano pulę 109 genotypów skrajnie różniących się reakcją na suszę. Związek parametru fizjologicznego z markerem oceniano wyznaczając współczynnik korelacji rang Spearmana, wszystkie markery oceniano wyznaczając ich wartość selekcyjną. Analiza ta pozwoliła wskazać markery *bPb-6721*, *bPb-1312* i *bPb-8884* najsilniej skorelowane z największą liczbą współczynników fizjologicznych. Wyznaczone korelacje odnoszące się do parametrów fluorescencji chlorofilu Autorka interpretowała w odniesieniu do funkcjonowania fotosystemu II, gęstości centrów reakcji, wygaszania fotochemicznego oraz wybranych parametrów gospodarki wodnej.

Interesująca, jakkolwiek poboczna dla głównego tematu dysertacji, była analiza korelacji markerów z innymi niż reakcja na stres cechami agronomicznymi, wśród których były cechy zdolności plonotwórczej i odporności na wybrane choroby. Efektem tego etapu było wskazanie trzech markerów *bPb-6721*, *bPb-6399* i *bPb-7786* pozwalających na selekcję roślin o podniesionej odporności na choroby.

Zagęszczanie markerów w wybranych rejonach genomu jęczmienia pozwoliło dodać 34 nowe markery tolerancji suszy. W tej części pracy Doktorantka genotypując 109 form jęczmienia, uzyskała 15828 markerów DArTseq. Z tej puli wybrała 1649 sekwencji zróżnicowanych we wszystkich genotypach i wykazujących najwyższe wartości PIC, które docelowo zagęściły markery wybranych regionów genomu jęczmienia.

Wyniki kolejnego etapu tj. mapowania asocjacyjnego 1797 markerów pozwoliły wyznaczyć wartości asocjacji tych markerów z parametrami fizjologicznymi. W tej części na uwagę zasługuje umieszczenie 9 markerów związanych z 24 parametrami aktywności fotosyntetycznej w regionie od 141,01 do 148,16cM chromosomu 2H. Region chromosomu 4H wykazujący asocjację z parametrami aktywności fotosyntetycznej został uzupełniony dodatkowymi 5 markerami.

Identyfikacja markerów mrozooporności i zimotrwałości w doświadczeniu 2 pozwoliła wskazać 3 markery *bPb-1593*, *bPb-7975* i *bPb-7024* przydatne do selekcji mrozooporności. Markery te były dodatkowo skorelowane z cechami agronomicznymi: wysokością roślin, zawartością białka w ziarnie, odpornością na mączniaka prawdziwego i rdzę karłową. Przydatność wytypowanych markerów była weryfikowana w dwóch grupach eksperymentów



z wykorzystaniem genotypów różniących się tolerancją na stresy środowiskowe oraz różniących się parametrami fizjologicznymi związanymi z reakcją na te stresy. W efekcie wykonanych analiz Doktorantka wytypowała markery, które jej zdaniem, będą dobrze służyły selekcji ukierunkowanej na podniesienie tolerancji suszy oraz, w innej grupie roślin, selekcji mrozoodporności i zimotrwałości. Wskazanie takich markerów zaliczyłbym do najważniejszych osiągnięć Doktorantki. W kolejnych etapach badano asocjację tych markerów z parametrami fizjologicznymi, charakteryzującymi reakcje roślin na stres suszy a w analogicznej części dotyczącej jęczmienia ozimego badano korelacje markerów z mrozoodpornością i zimotrwałością.

W pracy tak obszernej trudno uniknąć błędów edytorskich czy redakcyjnych. Tekst dysertacji jest nasycony symbolami markerów i zachowanie podobnej kolejności w odpowiadających sobie opisach i tabelach znacznie uprościłoby odczytywanie tych markerów i ich porównywanie (np. tabela 14 i 15). W kilku miejscach symbole markerów się różnią i nie jest jednoznaczne czy jest to literówka czy nowy symbol. Na przykład symbol Bmac209a w tabelach 13, 14 oraz odpowiadający mu symbol Bmab209 w tabelach 16a, 16b, 17a, 17b. Symbolowi markera czasami dodatkowo towarzyszy pojedyncza litera, która prawdopodobnie wskazuje na jeden z alleli, jednak nie jest to opisane w legendzie (np. tabele 14, 15). Pomyłkowo opisano zawartość tabeli 18, jako zestawienie współczynników korelacji rang Spearmana i wartości selekcyjnej (str. 94), a w rzeczywistości są to dane pogodowe.

[Autorka zamiennie używa terminów zimotrwałość i mrozoodporność. Prosiłbym ją o odpowiedź, czy jest to poprawne i jeżeli tak to, dla jakich warunków?](#)

Dane na temat pomiarów fluorescencji chlorofilu oraz wnioskowanie na podstawie tak uzyskanych wyników o bardzo zróżnicowanych cechach fenotypowych są obecnie bogato opisywane w literaturze, na którą składa się kilkadziesiąt publikacji i opracowań. Publikacje te są w bardzo dużym stopniu opisowe. Mimo, iż w tych pracach wskazuje się na określone struktury i procesy to praktycznie brak badań, w których funkcje tych struktur oraz ich związek z mierzonym parametrem fluorescencji chlorofilu byłby weryfikowany w bezpośrednim eksperymencie. Trochę analogicznie jak weryfikowana jest funkcja enzymów w badaniach biochemicznych czy genów w genetyce molekularnej. Część recenzowanej pracy doktorskiej poświęcona jest mapowaniu i lokalizowaniu w określonych regionach chromosomów jęczmienia parametrów fluorescencji chlorofilu, ważnych dla oceny reakcji roślin na czynniki środowiskowe. Moim zdaniem ten bardzo interesujący aspekt pracy jest istotnym uzupełnieniem licznych publikacji, gdzie pomiar fluorescencji był cechą diagnostyczną reakcji na stres.

Kolejny i chronologicznie ostatni etap dysertacji, na początkowym schemacie opisano jako „Doświadczenie 3”, to analiza bioinformatyczna genomowych sekwencji nukleotydowych markerów. Analiza ta została ukierunkowana na identyfikację genów, fragmentów regulatorowych lub białek zakodowanych w tych regionach genomowego DNA, z których pochodzą określone markery. Autorka badając podobieństwo tych sekwencji do znanych klonów cDNA, genów lub białek, starała się odkryć potencjalne funkcje biologiczne zapisane w sekwencji nukleotydowej tych markerów lub w blisko położonych regionach. Tak zaprojektowana i wykonana analiza bioinformatyczna była kontynuowana eksperymentalnie, czego efektem była charakterystyka profili ekspresji zidentyfikowanych genów.

Korzystając z wielu nukleotydowych i białkowych baz danych, dla wybranych sekwencji DArT, Autorka zidentyfikowała odpowiadające im kontigi genomu jęczmienia. Następnie analizując te kontigi wskazała, że znajdują się tam regiony podobne do znanych genów lub regiony kodujące białka podobne do znanych białek. Na podstawie tak wykazanego podobieństwa sekwencji lub obecności domen Autorka wnioskuje o obecności w tych



regionach genów pełniących określone funkcje biologiczne. Korzystając z tej strategii bioinformatycznej i lokalizacji 8 markerów DArT tolerancji suszy Autorka zidentyfikowała odpowiednie kontigi oraz 8 białek o potencjalnej funkcji w reakcji rośliny na deficyt wody lub odporności na choroby. Podobne postępowanie z 6 markerami mrozoodporności pozwoliło Doktorantce znaleźć siedem białek o potencjalnych funkcjach w reakcji na niskie temperatury. W opisie dokładnie przedstawiona jest ścieżka bioinformatycznego identyfikowania każdego z tych białek.

Ten etap bioinformatyczny - eksperymentalny jest interesujący, jednak jego włączenie do pracy dedykowanej markerom genetycznym tolerancji badanych stresów środowiskowych wymaga dodatkowego komentarza i dyskusji.

Najważniejszą cechą sekwencji nukleotydowej markera genetycznego jest polimorfizm tej sekwencji obserwowany w badanej populacji. Jeżeli tak znaleziony marker zawsze kosegreguje z badaną cechą, wówczas możemy założyć, że genetyczna odległość markera od genu warunkującego cechę jest bardzo mała. W skrajnym przypadku może on być zlokalizowany dosłownie w genie warunkującym daną cechę. Spełnienie tych kryteriów jest jednak skrajnie trudne (żeby nie powiedzieć praktycznie niemożliwe) w przypadkach, gdy badane są cechy dziedziczone ilościowo i na dodatek ich fenotypowanie silnie zależy od warunków środowiska. Tolerancja suszy oraz mrozoodporność są przykładami takich właśnie cech.

Po tym komentarzu i bez rozstrzygania o związku markera i genu, prosiłbym Doktorantkę o dyskusję tego zagadnienia i ocenę prawdopodobieństwa, że sekwencja nukleotydowa markera (lub zlokalizowana w regionie markera) jest genem, którego funkcja jest związana z markerowaną cechą.

Niezależnie od powyższej uwagi, adnotacja sekwencji DArTseq może prowadzić do interesujących spostrzeżeń i identyfikowania genów potencjalnie zaangażowanych w określone funkcje. W tym przypadku Autorka wskazała geny, których profile ekspresji wykazywały zależność od genotypu i warunków środowiskowych. Wśród tak adnotowanych genów interesujące jest podobieństwo do genów potencjalnie warunkujących zmiany epigenetyczne. Na podkreślenie zasługuje również sposób wytypowania genów referencyjnych, co jest zadaniem zawsze trudnym. Dyskusja tej części dysertacji jest wielopoziomowa. Autorka cytuje badania roślin modelowych *Arabidopsis* i *Brachypodium* a w końcowej konkluzji wskazuje, że ostateczną weryfikacją biologicznej funkcji adnotowanego genu jest bezpośredni eksperyment z użyciem roślin z nadekspresją bądź wyciszoną ekspresją badanego genu.

Dysertacja podsumowana jest siedmioma wnioskami, którymi Autorka zwróciła uwagę na swoje najważniejsze osiągnięcia. Wnioski 3 i 4 wskazują na markery, które dzięki silnemu sprzężeniu z tolerancją suszy *bPb-6721*, *bPb-5450* i *bPb-1312* oraz z mrozoodpornością *bPb-1593*, *bPb-7975* i *bPb-1815* mogą być stosowane w selekcji jęczmienia. Na podkreślenie zasługuje wskazanie asocjacji zwiększonej aktywności fotosyntetycznej i podniesionej tolerancji na suszę. Wniosek ten pozwala przypuszczać, że zastosowana strategia identyfikowania markerów jest możliwa do wykorzystania również u innych gatunków roślin uprawnych. Dwa ostatnie wnioski odnoszące się do analizy bioinformatycznej i wskazania genów kandydujących związanych z reakcją rośliny na czynniki stresowe podkreślają zrozumienie przez Doktorantkę możliwości i ograniczeń związanych z tą strategią.

Pozytywna ocena pracy doktorskiej byłaby niepełna bez podkreślenia, że część wyników została już opublikowana *Journal of Applied Genetics* **56**: 299–309 w artykule: Fiust A.,

Rapacz M., Wójcik-Jagła M, and Tyrka M „Development of DArT-based PCR markers for selecting drought-tolerant spring barley” oraz, że badania realizowano w ramach Programu Badań Stosowanych finansowanego przez NCBiR, grantu PRELUDIUM przez NCN oraz przy współudziale środków Europejskiego Funduszu Społecznego „Doctus – Małopolski fundusz stypendialny”.

### **Podsumowanie**

Wszystkie części ocenianej dysertacji są poprawnie przygotowane i zredagowane. Część eksperymentalna została zaprojektowana tak, aby zebrane wyniki pozwoliły wyczerpująco odpowiedzieć na postawione we wstępie pytania i w pełni zrealizować cel badań.

Opracowanie wskazuje na wysokie umiejętności techniczne, merytoryczną wiedzę i bardzo dużą pracę Autorki. Nieliczne błędy nie zmieniają pozytywnego odbioru pracy a uwagi krytyczne są wynikiem innego spojrzenia na niektóre z omawianych problemów.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę i) wzbogacają naszą wiedzę na temat fizjologicznych i genetycznych reakcji jęczmienia na stres suszy i niskiej temperatury, ii) opisują nową ścieżkę identyfikowania markerów genetycznych, iii) wskazują markery genetyczne pozwalające na selekcję roślin jęczmienia o podniesionej tolerancji tych stresów oraz iv) zawierają inspirującą do dyskusji propozycję identyfikowania genów kandydujących zaangażowanych w procesy odpowiedzi rośliny na stresy środowiskowe.

**Rozprawę doktorską oceniam, jako właściwą pod względem formalnym oraz wartościową merytorycznie. Analiza dysertacji dowodzi, że Autorka jest dojrzałym naukowcem zasługującym na awans naukowy.**

**Uzyskane wyniki oraz przedstawiona dysertacja spełniają wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Fiust do dalszych części przewodu doktorskiego.**

Radzików 17.02.2017.



Prof. dr hab. Wacław Orczyk  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Inżynierii Genetycznej  
Radzików, 05-870 Błonie  
E-Mail: [w.oreczyk@ihar.edu.pl](mailto:w.oreczyk@ihar.edu.pl)