



INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN

IM. FRANCISZKA GÓRSKIEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków; EMAIL ifr@ifr-pan.edu.pl; TEL. 124251833

dr hab. Tomasz Hura
Instytut Fizjologii Roślin
Polska Akademia Nauk
ul. Niezapominajek 21
30-239 Kraków

Kraków, 14.02.2017.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Gietler pt.: „Analiza zmian w proteomie siewek pszenicy (*Triticum aestivum* L.) różniących się wrażliwością na deficyt wody” wykonanej w Katedrze Biochemii Wydziału Rolnictwa i Biologii SGGW.

Promotor pracy: Prof. dr hab. Barbara Zagdańska

Promotor pomocniczy: Dr inż. Małgorzata Nykiel

Praca doktorska mgr Marty Gietler została wykonana w ramach studiów doktoranckich podjętych w 2012 roku. Dotyczy ona ważnego problemu dla rolnictwa jakim jest zjawisko suszy wiosennej, która niekorzystnie oddziałuje na zboża jare we wczesnej fazie wzrostu. Coraz częściej występujące skrajne zjawiska pogodowe, jak susza jesienna, krótka i bezśnieżna zima czy upały wiosenne zwiększają prawdopodobieństwo występowania takiej suszy. Stąd szczegółowe rozpoznanie reakcji zbóż jarych na deficyt wody we wczesnej fazie wzrostu może wspomóc proces selekcji zmierzający do uzyskania odmian o zwiększonej tolerancji na suszę, a także odmian o zwiększonej efektywności wykorzystania wody. Ważnym etapem w tym procesie są badania nad morfologicznymi, fizjologicznymi, biochemicznymi i w końcu molekularnymi podstawami wrażliwości roślin na deficyt wody. Na tym tle praca doktorska mgr Marty Gietler jest wyjątkowo aktualna i potrzebna.

W skład przedstawionej do recenzji rozprawy wchodzi trzy spójne tematycznie prace wieloautorskie, których Doktorantka jest pierwszym autorem. Dwie prace opublikowano w latach

2015-2016, trzecia z prac została przyjęta do druku i prawdopodobnie ukaże się w roku 2017. Są to czasopisma znajdujące się w bazie Journal Citation Reports (JCR), o wysokim współczynniku oddziaływania: Plant Growth Regulation (IF 2,333), Plant Physiology and Biochemistry (IF 3,434) oraz Environmental and Experimental Botany (IF 3,707). Jest to niewątpliwie znaczący dorobek naukowy, jak na osobę ubiegającą się o stopień naukowy doktora.

Opublikowane prace eksperymentalne poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim oraz szerokie omówienie własnych wyników na tle dostępnej literatury. Na końcu pracy zamieszczono 10 oświadczeń współautorów o wkładzie w powstanie publikacji wskazujących na kluczową rolę Doktorantki w realizacji opisanych eksperymentów i analiz, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów.

Tytuł rozprawy w pełni odpowiada zawartej w niej treści. Zasadniczym celem rozprawy było rozpoznanie biochemicznych i molekularnych podstaw przełamania odporności na deficyt wody u siewek pszenicy. Cel ten realizowano m.in. przez analizę zależności pomiędzy potencjałem oksydacyjno-redukcyjnym komórki, a potranslacyjnymi modyfikacjami białek. Jak dotąd zagadnienie to nie zostało w pełni wyjaśnione, a w dostępnej literaturze można znaleźć wiele sprzecznych informacji.

Materiałem roślinnym w badaniach były siewki pszenicy jarej odmiana Zadra. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono na 4-dniowych siewkach odpornych na odwodnienie oraz 6-dniowych siewkach wrażliwych na deficyt wody. Niewątpliwie zaletą tego modelu doświadczalnego, co podkreśla Doktorantka, jest brak różnic genetycznych pomiędzy badanymi obiektami i możliwość skoncentrowania na biochemicznych i molekularnych przyczynach skrajnej odpowiedzi siewek pszenicy na niedobór wody.

Podkreślić należy, że analizy prowadzone były m.in. z zastosowaniem nowoczesnych metod z zakresu biologii molekularnej, w sposób kompleksowy, co dodatkowo podnosi wiarygodność uzyskanych rezultatów. Na uwagę zasługuje fakt, że część analiz Doktorantka wykonała w Instytucie Biochemii i Biologii Uniwersytetu Poczdamskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Joerga Fettke.

Stwierdzam, że rozprawa stanowi samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej metodyki badań z zastosowaniem bardzo dobrze zdefiniowanego materiału roślinnego.

Opublikowane prace pod względem merytorycznym nie budzą żadnych zastrzeżeń. Przedstawione w nich wyniki podlegały wnikliwej i surowej ocenie edytorów czasopism oraz recenzentów będących ekspertami z zakresu biologii stresu. W pierwszej z nich badano zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego w warunkach odwodnienia komórek. Stwierdzono, że pod wpływem deficytu wody następuje modyfikacja potencjału oksydacyjno-redukcyjnego i zmiany w proteomie siewek pszenicy. Wskazano, że wzrost poziomu reaktywnych form tlenu i intensywne utlenianie lipidów w siewkach wrażliwych na deficyt wody, jest jedną z przyczyn obniżonej zdolności tolerowania odwodnienia. Zaobserwowano także, że wyższa aktywność reduktazy glutationowej i peroksydazy askorbinianowej nie zapobiegła utracie tolerancji siewek na deficyt wody. Na podstawie analizy aktywności proteolitycznej i zawartości białek karbonylowanych wykazano intensywne utlenianie grup funkcyjnych białek oraz ich szybką degradację w warunkach deficytu wody. Bardzo ciekawym wynikiem przedstawionym w tej pracy, była identyfikacja proteinaz cysteinowych i aspartylowych, jako głównych enzymów zaangażowanych w przebudowę proteomu oraz wykazanie ich wyższej aktywności w siewkach wrażliwych.

Analizowano również przeżywalność siewek jako wskaźnika określającego zdolność do wznowienia wzrostu elongacyjnego po okresie deficytu wody. Wykazano, że obniżona przeżywalność siewek wrażliwych na odwodnienie była konsekwencją 50% spadku całkowitej zawartości glutationu (GSH+GSSG) oraz wzrostu zawartości utlenionego glutationu w stosunku do jego zredukowanej postaci (GSH/GSSG). **W odniesieniu do tej pracy proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego przyjęła świeżą masę jako układ odniesienia w analizach ilościowych glutationu i askorbinianu.**

Druga ze zbioru prac dotyczy wpływu zmian homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej na potranslacyjne modyfikacje białek, S-glutationylację i S-nitrozylację. Wykazano zwiększoną S-glutationylację białek u tolerancyjnych siewek. Były to białka związane z **proteolizą** (mitochondrialna FTSH 5, inhibitor proteinaz cysteinowych), **metabolizmem energetycznym** (OEE1, anhydraza węglanowa), **metabolizmem kwasów nukleinowych i białek** (białka rybosomalne), **stresem i transdukcją sygnału** (CCaMK kinaza białkowa zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny, thionina BTH6). W pracy podkreślono, że ta modyfikacja u tolerancyjnych siewek może chronić białka przed oksydacyjnymi uszkodzeniami. Przeprowadzony eksperyment jasno wykazał zwiększoną intensywność S-nitrozylacji 40% białek (głównie związanych z translacją np. białka rybosomalne, bogate w glicynę białko wiążące RNA) w siewkach wrażliwych w odróżnieniu od siewek tolerancyjnych, u których jedynie 25% białek była S-nitrozylowana (białka powiązane z metabolizmem energetycznym: syntaza ATP, OEE2).

Trzecia z prac dotyczy karbonylacji białek. Wykazano, że utrata tolerancji odwodnienia przez siewki 6-dniowe, związana była m.in. ze zwiększoną karbonylacją białek odpowiedzialnych za pulę ATP (podjednostki ATP-az wakuolarnych i syntazy ATP). **Bardzo interesującym wynikiem, mającym znaczenie dla przyszłych badań, było wykazanie zależności funkcjonalnych pomiędzy zidentyfikowanymi białkami karbonylowanymi u tolerancyjnych siewek.** Stwierdzono także, że w siewkach tolerancyjnych zmiany stopnia karbonylacji białek związanych z metabolizmem kwasów nukleinowych, wpływających na stabilność DNA i proces transkrypcji (histon 2A, syntetaza adenylbursztynianowa, białko 44 zawierające domenę palca cynkowego CCCH), mogą mieć znaczenie w zmianie profilu ekspresji genów w warunkach niedoboru wody i tym samym w aklimatyzacji roślin do suszy.

W tym miejscu chciałbym podkreślić, że w każdej z prac otrzymane wyniki przedstawiono w sposób jasny i w logicznej kolejności, zostały one prawidłowo zinterpretowane oraz przedyskutowane z wykorzystaniem ważnych pozycji literatury z zakresu tematu pracy. Dobór i sposób omawiania literatury przedmiotu oraz rzetelne dyskusowanie z nią własnych wyników potwierdzają wysoki poziom wiedzy Doktorantki w zakresie biologii roślin. Sformułowane w rozprawie wnioski są adekwatne do uzyskanych wyników i w pełni uzasadniane. Na podkreślenie zasługuje także bardzo dobry warsztat badawczy Doktorantki oraz umiejętność weryfikacji uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

Uważam, że rozprawa Pani mgr Marty Gietler stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane wyniki stanowią istotny oryginalny element rozwoju badań nad zmianami w proteomie siewek pszenicy różniących się wrażliwością na deficyt wody. Doktorantka wykazała się umiejętnością realizacji założonych celów badawczych, pracy zespołowej i publikacji wyników badań.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim w Artykule 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. W związku z powyższym wnoszę do

Wysokiej Rady Wydziału Rolnictwa i Biologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Marty Gietler do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stawiam również wniosek o wyróżnienie recenzowanej pracy. Do wartościowych wyników zaliczyć należy wykazanie złożonego mechanizmu zmian w proteomie siewek pszenicy w warunkach deficytu wody oraz identyfikację białek odpowiedzialnych za utratę tolerancji odwodnienia. Bardzo ważnym jest również fakt opublikowania prac w bardzo dobrych czasopismach o międzynarodowym zasięgu.



Dr hab. Tomasz Hura