



prof. dr hab. Artur Jarmołowski
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Zakład Ekspresji Genów
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań
tel. 61-829-5959
e-mail: artjarmo@amu.edu.pl

Poznań, 07. 02. 2023

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Michała Kempy pod tytułem: „Wpływ stresów abiotycznych na zmiany metabolomu ze szczególnym uwzględnieniem lipidów u form jęczmienia jarego o zróżnicowanym fenotypie i polimorfizmie genu *ns-LTP2*.”

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej jej Autor, mgr Michał Kempa, omawia wyniki naukowe, które uzyskał w Zakładzie Fenomiki Zbóż Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, pracując pod kierunkiem dr hab. Anety Kuczyńskiej - promotora ocenianej przeze mnie dysertacji. Promotorem pomocniczym rozprawy mgr Michała Kempy jest dr Krzysztof Mikołajczak. W ocenianej pracy przedstawiono interesujące wyniki wielokierunkowych badań nad zmianami obserwowanymi u jęczmienia jarego pod wpływem trzech stresów abiotycznych: deficytu wody, zasolenia oraz wysokiej temperatury, oddziałujących na badane rośliny pojedynczo lub też we wszystkich możliwych kombinacjach.

Praca doktorska mgr Michała Kempy to napisany w języku polskim manuskrypt. Rozpoczyna się obszernym wstępem, w którym Doktorant szczegółowo



scharakteryzował wykorzystany w badaniach gatunek zboża, przedstawił również wymagania jego uprawy, a także omówił wpływ wybranych stresów abiotycznych na jego plonowanie. Następny podrozdział tej części rozprawy został poświęcony specjalnej grupie białek odpowiedzi na stres zwanych białkami transportującymi lipidy, czyli białkami LTP. Zostały one omówione w części wstępnej rozprawy szczególnie dokładnie, ponieważ mgr Michał Kempa przedstawił w swojej dysertacji wyniki związane w tą właśnie grupą czynników odpowiedzi na stres. Ostatni podrozdział części wprowadzającej w zagadnienia omawiane w pracy doktorskiej mgr Michała Kempy dotyczy wykorzystania danych wysokoprzepustowych w badaniach wpływu stresu na rośliny. Wszystkie wymienione części Wstępu zostały bardzo starannie przygotowane na podstawie najnowszej literatury naukowej. Nie mam wątpliwości, że mgr Michał Kempa zapoznał się w cytowanych w swojej pracy artykułami i starannie wybrał z nich informacje potrzebne do napisania tego interesującego przeglądu literaturowego. Wspomnę w tym miejscu, że zamieszczone ma końcu manuskryptu zestawienie wykorzystanych do przygotowania dysertacji lista publikacji liczy aż 565 pozycji! To chyba najdłuższa lista literaturowa, z jaką się spotkałem w recenzowanych przeze mnie do tej pory pracach doktorskich. Wstęp przygotowany przez mgr Michała Kempę bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia, które pojawiają się później w części poświęconej uzyskanym wynikom, a także w rozdziale zatytułowanym Dyskusja. Dodam, że zamieszczony w rozprawie Wstęp czytałem z ogromną przyjemnością i zainteresowaniem.

W następnym rozdziale ocenianej pracy doktorskiej Autor przedstawił założenia i cele podjętych w ramach doktoratu badań naukowych. Jak czytamy w tej części rozprawy, celem była kompleksowa analiza mechanizmów determinujących tolerancję jęczmienia na zróżnicowane warunki środowiskowe. Magister Michał Kempa sformułował cztery klarowne hipotezy badawcze, które postanowił zweryfikować, wykonując zaplanowane przez siebie eksperymenty. Pierwsza



hipoteza zakładała, że w zależności od rodzaju i intensywności czynnika stresującego obserwowane zmiany poszczególnych metabolitów różnią się między sobą, szczególnie tych związków, które warunkują lepsze przystosowanie się roślin do zmieniających się warunków środowiskowych. W drugiej hipotezie założono, że za zmiany profilu metabolicznego wywołane określonym stresem lub kombinacją różnych warunków stresowych odpowiada głównie czynnik genetyczny. W trzeciej hipotezie Autor dysertacji założył, że działanie kilku stresów jednocześnie ma inny wpływ na cały metabolom niż każdy ze stresów działających oddzielnie. Ostatnia zaproponowana przez mgr Michała Kempę hipoteza zakładała, że pod wpływem stresów abiotycznych dochodzi do indukcji ekspresji genu *na-LTP2* w tkankach wegetatywnych determinujących zmienność lipidomu i fenomu jęczmienia. Zarówno cel badań, jak i towarzyszące mu hipotezy badawcze zostały jasno i prawidłowo sformułowane. Opisane w pracy eksperymenty zostały zaplanowane w taki sposób, aby zweryfikować postawione hipotezy i osiągnąć przedstawiony cel badawczy.

Rozdział rozprawy zatytułowany Materiały i metody precyzyjnie opisuje wykorzystany w badaniach materiał biologiczny, użyte do badań odczynniki oraz zastosowane w pracy metody i techniki. Nie mam do tej części ocenianej rozprawy poważniejszych uwag. Ta część została przygotowana przez Doktoranta bardzo starannie, bez trudu znalazłem tutaj wszystkie informacje potrzebne mi do zrozumienia, jak zostały wykonane poszczególne, opisane w manuskrypcie eksperymenty.

Najobszerniejszą częścią ocenianej rozprawy jest oczywiście rozdział, w którym mgr Michał Kempa opisał wyniki wykonanych przez siebie doświadczeń. Z pokazanych w pracy analiz metabolomów różnych linii jęczmienia poddanych różnorodnym stresom abiotycznym wynika, że profil metabolitów związany jest przede wszystkim z genotypem badanej linii jęczmienia. Co ciekawe, poszczególne



badane linie odmiennie reagowały na poszczególne warunki stresowe, włączając specyficzne dla nich ścieżki odpowiedzi na niekorzystne warunki wzrostu, np. syryjska linia CamB1 odpowiadała na stres akumulacją aminokwasów, linie MPS związków cukrowych, natomiast u Maresi wzrastała efektywność ścieżek związanych z metabolizmem azotu. Co bardzo ciekawe, linia CamB1 oprócz obserwowanego w warunkach stresu wzrostu osmoprotektantów i antyoksydantów, a także bardzo wysokim poziomem kampesterolu, sigmasterolu i $\Delta 5$ -awanasterolu, ma wyraźnie skrócony czas wegetacji, dobrze dostosowany do ciepłego i suchego klimatu. Niestety, plonowanie tej linii jest stosunkowo słabe. Z drugiej strony, mgr Michał Kempa pokazał, że linie europejskie MPS wyróżniają się spośród innych badanych linii zwiększoną akumulacją wielu metabolitów, podobnie do linii syryjskiej, ale charakteryzują się znacznie lepszymi parametrami cech plonotwórczych. Opisane w pracy doktorskiej zmiany w poziomie różnorodnych steroli wskazały, że wyraźnie akumulują się one w warunkach symultanicznego działania stresów abiotycznych, np. stresu wysokiej temperatury i niedoboru wody, jedynie $\Delta 5$ -awanasterol zachowuje się odmiennie – jego stężenie wzrasta, jeśli stresy działają pojedynczo, a nie wspólnie. Podczas obrony chciałbym zapytać Doktoranta, jak można wytłumaczyć taką różnicę pomiędzy $\Delta 5$ -awanasterolem, a pozostałymi fitosterolami? Na czym miałyby polegać szczególna rola $\Delta 5$ -awanasterolu w przeciwdziałaniu różnym stresom abiotycznym? Niezwykle ciekawym wynikiem zamieszczonym w rozprawie mgr Michała Kempy jest obserwacja, że ekspresja genu *ns-LTP2* ma miejsce w aleuronie oraz w osi zarodkowej. Oznacza to, że odpowiedź rośliny na stres dotyczy również rozwijającego się zarodka. Wyniki te sugerują, że białko ns-LTP2 może odgrywać ważną rolę w zwiększaniu tolerancji rośliny na stres. Magister Michał Kempa pokusił się także o korelację profilu metabolomu z cechami fenotypowymi badanych linii jęczmienia. Tę część wyników uważam za bardzo cenną, gdyż pozwala precyzyjnie powiązać zmiany metabolomu z określonymi cechami fenotypowymi, takimi jak np. budowa kłosa głównego i kłosów bocznych, co



ma olbrzymie znaczenie przy poszukiwaniu nowych cech odpowiedzialnych za plonowanie jęczmienia. Ciekawe jest też porównanie wpływu stresu suszy, wysokiej temperatury i zasolenia działających solo oraz w kombinacji dwóch z nich lub też wszystkich trzech badanych czynników stresowych. Zdziwił mnie fakt, że jednoczesne działanie stresu zasolenia i wysokiej temperatury wpływa na metabolom w sposób bardzo specyficzny, różny od zmian profilu metabolitów obserwowanych w stresie zasolenia i stresie podwyższonej temperatury działających oddzielnie. Podobne obserwacje poczyniono w przypadku zmian w metabolomie wywołanych działaniem wszystkich trzech badanych stresów równocześnie. Chciałbym dowiedzieć się w trakcie obrony, jaki mógłby być potencjalny mechanizm takich różnic. Czy jest to związane z rodzajem działających na rośliny stresów, czy raczej z intensywnością sygnałów stresowych?

Rozdział zatytułowany Wyniki został napisany jasno, mam jedynie pewne zastrzeżenia co do opisu samej metodyki wykonywania poszczególnych doświadczeń. Wszystkie techniczne opisy doświadczeń znajdują się w rozdziale Materiały i metody, czyli tam, gdzie powinny się znaleźć. Przy opisie wyników nie ma jednak żadnych informacji o zastosowanej metodzie, co utrudnia, moim zdaniem, analizę przedstawionych danych oraz ich interpretację. Wiem, że namawiam do pewnego powtórzenia informacji technicznych, ale minimalny, nawet dwu-, trzyzdaniowy opis założeń metodycznych danego eksperymentu bardzo ułatwiłby analizę uzyskanych wyników. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że wykonana analiza metabolomu różnych linii jęczmienia jest podejściem niezwykle oryginalnym, a uzyskane i opisane w ocenianej rozprawie doktorskiej wyniki mają duże znaczenie praktyczne przy poszukiwaniu nowych cech odpowiedzialnych za zwiększone zdolności adaptacyjne oraz dobre plonowanie jęczmienia, nawet w warunkach suboptymalnych. Doceniając wagę zgromadzonych danych dotyczących metabolomu, chciałbym zasugerować wykonanie jednocześnie badań transkryptomicznych i proteomicznych. Wydaje mi się, że profile metabolomów



porównane z wynikami badań transkryptomicznych i proteomicznych pozwoliłyby lepiej zrozumieć molekularne mechanizmy odpowiedzi rośliny na stres. Zdaję sobie oczywiście sprawę z kosztów takiego globalnego -omicznego podejścia, które jednak wydaje mi się niezbędne dla prawidłowej i głębokiej analizy danych metabolomicznych.

Podsumowując, w pracy doktorskiej mgr Michała Kempy opisano wyniki oryginalnych eksperymentów. Zostały one bardzo dobrze skonfrontowane z danymi literaturowymi i na podstawie takich porównań sformułowano właściwe wnioski końcowe. Uważam, że oceniana rozprawa w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Dlatego przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu wniosek o dopuszczenie mgr Michała Kempy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Artur Jarmołowski