

Dr hab. Beata Myśków
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr. Michała Kempy,

pt. „Wpływ stresów abiotycznych na zmiany metabolomu ze szczególnym uwzględnieniem lipidów u form jęczmienia jarego o zróżnicowanym fenotypie i polimorfizmie genu *ns-LTP2*”

TEMATYKA BADAWCZA

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Anetty Kuczyńskiej, prof. IGR PAN i dr. Krzysztofa Mikołajczaka. Doktorant prowadził badania w Zakładzie Fenomiki Zbóż, w zespole kierowanym przez promotorkę rozprawy, we współpracy z naukowcami z innych zakładów IGR PAN w Poznaniu i innych ośrodków naukowych.

Przedmiot zainteresowań i materiał badawczy mgr. Michała Kempy stanowił jęczmień jary, jeden z ważniejszych gatunków zbóż w Polsce i na świecie, wykorzystywany w przemyśle spożywczym, paszowym i piwowarskim. Podjęta przez Doktoranta tematyka wpisuje się w szeroki i ważny obszar badań nad odpornością roślin na stresy abiotyczne.

Roślinne mechanizmy reagowania na niekorzystne warunki środowiskowe są tak złożone, że nawet wieloletnie badania nie dają pełnych odpowiedzi na pytania odnośnie ich podłoża. Wiele współczesnych przedsięwzięć naukowych, zarówno w zakresie badań podstawowych jak i stosowanych, koncentruje się na zrozumieniu mechanizmów leżących u podstaw reakcji na stres oraz identyfikacji specyficznych genów i ich produktów, odpowiedzialnych za fenotypy odporności. Podejścia „omiczne” umożliwiają wydajne analizy zmian wywołanych stresami środowiskowymi i dają szansę na ich powiązanie z danymi uzyskanymi za pomocą analizy fenotypowej.

Naukowcy badający różne gatunki podejmują prace zmierzające do oceny odpowiedzi na pojedynczy czynnik stresowy, ale coraz częściej także na łączne działanie dwóch stresorów. Doktorant podjął się analizy reakcji roślin jęczmienia na trzy rodzaje stresów abiotycznych, tj. suszy, wysokiej temperatury i zasolenia, aplikując je pojedynczo oraz w kombinacjach. Odpowiedź roślin była badana poprzez identyfikację szerokiego spektrum metabolitów oraz aktywności genu niespecyficznego białka transportującego lipidy (*ns-LTP2*) w różnych genotypach jęczmienia jarego, przy zastosowaniu różnorodnych technik analitycznych.

STRUKTURA PRACY I STRONA JĘZYKOWA

Rozprawa doktorska ma charakter monografii, napisana została po polsku. Dysertacja jest bardzo obszerna; liczy 178 stron i została podzielona na dziewięć rozdziałów, w tym sześć głównych: „Wstęp” (28 stron), „Cel i zakres pracy” (2 strony), „Materiały i metody” (17 stron), „Wyniki” (38 stron), „Dyskusja” (34 strony), „Podsumowanie i wnioski” (3 strony). Informacje o układzie pracy znalazły się przed główną częścią pracy, w „Spisie treści” (3 strony). Załączniki zajęły 26 stron, a bibliografia liczy 565 pozycji, z czego przeważająca większość to artykuły anglojęzyczne. Przed wykazem źródeł bibliograficznych zamieszczono trzystronicowe streszczenie w dwóch wersjach językowych (polskiej i angielskiej).

Struktura pracy jest dobrze dopasowana do charakteru pracy i specyfiki omawianych zagadnień. Treści odpowiednio podzielono na rozdziały i podrozdziały. Jedyną uwagę można odnieść do „pustych” nagłówków. Po nagłówku rozdziału powinien znaleźć się chociaż krótki tekst, a w wielu miejscach w pracy po tytule rozdziału następuje od razu tytuł podrozdziału.

Tytuły rozdziałów i podrozdziałów są dobrze sformułowane i adekwatne do treści w nich zawartych. Jedyną drobną niekonsekwencją było zatytułowanie jednego z podrozdziałów (2.1) rozdziału „Materiały i metody”, jako „Schemat doświadczenia”. W istocie zawiera on opis samego doświadczenia szklarniowego/wazonowego i takim tytułem należałoby być go opatrzyć, ponieważ w kolejnym podrozdziale (2.2) zgodnie z jego nagłówkiem wyodrębniono opis doświadczenia w fazie kiełkowania ziarniaków jęczmienia.

Praca jest napisana poprawnym, przystępnym językiem, z prawidłowym użyciem specjalistycznego słownictwa, prawie bez błędów językowych. W obszernym tekście pojawiły się nieliczne drobne potknięcia (np: „z pośród”, „w zmożonej”, „według Chmielewska”) czy tzw. skróty myślowe (np. „Sekwencje starterów w ocenie ekspresji” zamiast „Sekwencje starterów użytych w ocenie ekspresji”); „[...] startery namnażające sekwencję transkryptów” zamiast „startery użyte do namnażania sekwencji transkryptów”).

OCENA TREŚCI

We „Wstępie” rozprawy zawarto przegląd najważniejszych zagadnień dotyczących tematyki badawczej. Opisano gatunek pod kątem pochodzenia i zastosowania, podano pozycję systematyczną, scharakteryzowano budowę genomu. W tej części opisu znalazł się błąd dotyczący odniesienia wielkości genomu jęczmienia do genomu ryżu („Jęczmień charakteryzuje się genomem o wielkości w przybliżeniu $5,3 \times 10^9$ pz/1C, co czyni go mniejszym od genomu ryżu”). W istocie genom ryżu jest zdecydowanie mniejszy (ok. $4,3 \times 10^8$ pz). Przy omawianiu kariotypu jęczmienia zabrakło bezpośredniej informacji o liczbie chromosomów.

Opisano także materiał roślinny wykorzystywany w badaniach genetycznych z naciskiem na rodzaje materiałów użytych do własnych badań oraz poruszono tematy związane ze

zjawiskiem stresów abiotycznych i ich oddziaływaniem na rośliny. Skupiono się na czynnikach stresowych stosowanych i analizowanych w toku pracy badawczej, czyli suszy, zasoleniu, i wysokiej temperaturze. Kolejne zagadnienia omówione we „Wstępie” to geny z rodziny ns-LTP i kodowane przez nie białka oraz badania „omiczne” w aspekcie działających na roślinę stresów abiotycznych.

Przegląd literatury przedstawiony w ramach „Wstępu” został wykonany bardzo rzetelnie, a wszystkie związane z tematem pracy zagadnienia zostały omówione dostatecznie wyczerpująco. Ze względu na popularność jęczmienia jako przedmiotu badań i szeroki zakres tematyki badawczej łączącej zagadnienia z genetyki, biochemii, fizjologii czy agronomii, Doktorant musiał zapoznać się z bardzo licznymi źródłami bibliograficznymi. Szczególnym wyzwaniem było omówienie trzech typów stresów abiotycznych, analizowanych zarówno indywidualnie jak i łącznie, jako kombinacji wszystkich wariantów. Zestawienie zacytowanych prac świadczy o dużej znajomości literatury przedmiotu oraz o umiejętności dokonania właściwego doboru publikacji i dokładnego a zarazem syntetycznego opracowania informacji z licznych materiałów źródłowych.

Doktorant zadbał także o stronę graficzną tego rozdziału. Tekst „Wstępu” został wzbogacony o rysunek ilustrujący odpowiedź roślin na różne stresy abiotyczne i tabelę z zestawieniem technik badań proteomicznych w badaniach roślin poddanych działaniu wielu stresów abiotycznych, co było zabiegiem ułatwiającym odbiór obszernej treści.

Omówienie rozdziału „*Cel i zakres pracy*”

Doktorantowi udało się postawić cztery trafne hipotezy badawcze. Wyznaczone cele badań sformułowano precyzyjnie i dobrano odpowiednio do weryfikacji nakreślonych hipotez. Autor rozprawy podjął się kompleksowego zbadania mechanizmów determinujących tolerancję jęczmienia na zróżnicowane warunki środowiska, poprzez jakościowo-ilościowe oznaczenie zawartości metabolitów, lipidów, ocenę ekspresji genu *ns-LTP2* i detekcję białka ns-LTP2 w wybranych liniach jęczmienia.

Omówienie rozdziału „*Materiały i metody*”

Mgr Michał Kempa przeprowadził w swojej pracy naukowej bardzo liczne i zróżnicowane analizy, poczynając od fenotypowania, poprzez analizy biochemiczne i molekularne, aż do obróbki danych z użyciem metod statystycznych i informatycznych. Rozdział „*Materiały i metody*” przedstawia dokładną charakterystykę metod badawczych, a rozpoczyna się od schematu prac eksperymentalnych, co jest korzystnym zabiegiem pozwalającym łatwo zorientować się w obszernym zakresie podjętych prac.

Doktorant dysponował materiałem roślinnym, który stanowiło 12 linii jęczmienia (BC i RIL). W zależności od eksperymentu wykorzystywano zestaw czterech, ośmiu lub wszystkich dwunastu linii. Badane materiały roślinne zostały wyhodowane i wyselekcjonowane w toku wieloletnich prac zespołu, co pozwoliło Doktorantowi skupić się od razu na konkretnych analizach, w ramach podjętego tematu badawczego. Dobór linii jęczmienia został dobrze uzasadniony. Zabrakło jedynie informacji o wariantach allelicznych genu ns-LTP2 w liniach RIL, co poszerzyłoby możliwość interpretacji wyników odnośnie polimorfizmu tego genu i ewentualnego związku z badanymi cechami.

Opis materiału został opatrzony starannie przygotowanym materiałem ilustracyjnym, w formie fotografii młodych roślin i dojrzałych kłosów badanych linii, a także tabeli z ich charakterystyką oraz drzewa podobieństwa genetycznego linii BC.

Schemat doświadczenia zaplanowano odpowiednio do realizacji wytyczonych celów. W opisie doświadczenia wazonowego zabrakło jedynie informacji o masie donic z podłożem do uprawy roślin. Donice pokazane na zdjęciu 1b wydają się dość małe i jeśli to one były wykorzystane do doświadczeń, trudno wyobrazić sobie, że finalna liczba roślin w donicy wynosiła 10. Jest to istotne w aspekcie pomiarów morfologii roślin, które mogą być utrudnione przy dużym zagęszczeniu roślin.

Przeprowadzone eksperymenty dowodzą znajomości szerokiego spektrum metod analitycznych i umiejętności obsługi specjalistycznej aparatury. Przygotowanie materiału roślinnego wymagało bardzo dużego nakładu pracy, a dysekcja osi zarodkowych wiązała się zapewne z zegarmistrzowską precyzją.

Główne etapy badawcze poprzedzała ekstrakcja metabolitów, izolacja RNA i białka ogólnego. Badania metabolitów prowadzono z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS). Do analiz lipidów i steroli wykorzystano chromatograf gazowy sprzężony z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC/FID). Analizy transkrypcji dokonano z użyciem reakcji One-Step qRT-PCR. Doktorant opanował ponadto narzędzia do projektowania i walidacji starterów oraz oceny stabilności genów referencyjnych (algorytm geNorm, program CFX Maestro, Bio-Rad). Do analiz jakościowych białka ns-LTP2 wykorzystano metodę Western blot, a do oceny poziomu całkowitego białka rozpuszczalnego (CBR) i zawartości białka ns-LTP2 opracowano ilościowy test immunoenzymatyczny ELISA.

Obliczenia statystyczne wykonano stosując odpowiednio dobrane testy. Analizy wariancji, współzmienności cech i wykresy zostały wykonane w programie Genstat 19. Integrację wyników z różnych doświadczeń przeprowadzono metodą sieci korelacyjnych za pomocą pakietu WGCNA w systemie R.

Dobór i zakres zastosowanych przez Doktoranta metod badawczych świadczy o bardzo dobrej ich znajomości, umiejętnym opanowaniu warsztatu badawczego i jego konsekwentnym wykorzystaniu do realizacji założonych celów. Część analiz była wykonywana we współpracy z pracownikami innych Zakładów IGR PAN w Poznaniu, m.in. Z. Biotechnologii i Z. Biometrii

i Bioinformatyki, a część zrealizowano poza rodzimą instytucją, w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN. Dowodzi to umiejętności współdziałania z innymi naukowcami i zespołami badawczymi.

Omówienie rozdziału „Wyniki”

Podobnie jak przeprowadzenie doświadczeń, pomiarów i analiz, także zestawienie i statystyczne opracowanie ogromnej liczby uzyskanych danych stanowiło dla Doktoranta duże wyzwanie. Liczne wyniki zostały skrupulatnie opisane i starannie zilustrowane. Materiał dokumentacyjny ujęto w formie 13. tabel (z czego dwie w załączniku) i 13. wykresów (w tym jeden w załączniku), jednego rysunku i jednego zdjęcia.

Badania metabolomu doprowadziły m.in. do wykrycia w liściach jęczmienia 384. metabolitów, które zostały zidentyfikowane jako konkretne związki chemiczne. Na podstawie analizy wariancji wyodrębniono 122 metabolity, których poziom akumulacji był istotnie różny dla wariantów doświadczenia i ich kombinacji. W efekcie zidentyfikowano szereg metabolitów, których poziom akumulacji był zależny zarówno od badanych genotypów jak i warunków stresowych. Ważnym odkryciem była identyfikacja odmiennych sposobów reakcji na stres (szybsza akumulacja aminokwasów lub węglowodanów lub efektywny metabolizm azotu) w różnych formach jęczmienia.

Sama liczba wykrytych metabolitów dobrze obrazuje z jak dużym zakresem informacji Doktorant musiał się „zmierzyć”, podczas analizy i przedstawiania wyników. Poradził sobie z tym zadaniem np. poprzez odpowiednią selekcję i grupowanie. Wybrane metabolity podzielono na cztery grupy (związki aminokwasowe, cukrowe, kwasy organiczne i inne). Zmiana stężenia poszczególnych metabolitów była badana w warunkach stresowych (7 wariantów) względem kontrolnych, w czterech liniach, w trzech punktach czasowych. Liczba kombinacji zmiennych doświadczenia była zatem znacząca i sposób ich opisu zastępuje na pochwałę.

Uzyskane wyniki znacząco poszerzają aktualną wiedzę odnośnie reakcji roślin na stresy, a także dostarczają zupełnie nowej wiedzy (np. o zmianach zawartości norleucyny w liściach jęczmienia jarego). Doktorant uzyskał cenne dane na temat związków o mało poznanej funkcji u roślin (np. ornityny, glicyloglicyny i innych aminokwasów, 5-fosforanu rybozy i innych związków cukrowych, poliamin i kwasów organicznych) wskazując na ich możliwą rolę w reakcji roślin na niekorzystne czynniki środowiska. Stwierdzono odmienne efekty współdziałania stresów w porównaniu do stresów występujących indywidualnie.

Kolejnym nowym i cennym odkryciem było ustalenie zmian poziomu ekspresji genu *ns-LTP2* oraz akumulacji białka ns-LTP2 w osi zarodkowej ziarniaka jęczmienia w odpowiedzi na trzy stresy abiotyczne i ich kombinacje. Zawartość białka ns-LTP określano względem ogólnej rozpuszczalnej frakcji peptydowej CRP. Stwierdzono, że każdy z zastosowanych warunków stresowych spowodował wzrost zawartości transkryptu *ns-LTP2* w porównaniu z warunkami

kontrolnymi, natomiast zawartość białka ns-LTP2 w puli CBR z reguły spadała pod wpływem stresów abiotycznych. To zjawisko wydaje się niezwykle ciekawe, jednak uważam, że aby bardziej miarodajnie ocenić poziom akumulacji białka ns-LTP2 i odnieść go do zmian poziomu transkryptu należałoby dokonać przeliczenia zawartości białka ns-LTP2 względem masy tkanki. Moja sugestia wynika z faktu, że poziom białka ns-LTP2 ustalono względem CBR [ng/mg CBR], poziom CBR zaś był wyrażony w [mg/g tkanki], zatem taka sama zawartość białka ns-LTP2 w małej i dużej puli CBR stanowiła inne wartości w przeliczeniu na masę tkanki. Zmiana odniesienia zawartości ns-LTP2 poprzez przeliczenie jej na masę tkanki [mg/g tkanki] wydaje się lepiej obrazować „realny” poziom transkryptu. Jako, że poziom CBR wykazywał duże wahania, a wzrost puli ns-LTP2 niekoniecznie był skorelowany ze wzrostem CBR (przyjęcie to nasuwa się na podstawie analizy Wykresu 11) przeliczenie jednostek mogłoby wpłynąć na zmianę współczynnika korelacji między zawartością transkryptu i białka ns-LTP2.

Charakterystyka fenotypowa materiału roślinnego obejmująca 15 cech to kolejny dowód na pracowitość i skrupulatność Doktoranta. W efekcie tej części badań zaobserwowano ciekawą prawidłowość odnotowując największą wartość dla znacznej części badanych cech w warunkach stresu temperaturowego oraz jego współdziałania ze stresem zasolenia. Mogłoby to sugerować, że warunki kontrolne doświadczenia nie zawsze były optymalnymi dla rozwoju roślin.

Interesującym i korzystnym rozwiązaniem w analizie wyników było zastosowanie analizy korelacji pomiędzy wynikami z poszczególnych eksperymentów, przeprowadzonej za pomocą metody sieci korelacyjnych. Pozwoliło to na wyodrębnienie 15. grup cech, w których znalazły się cechy fenotypowe i związki metaboliczne w największym stopniu ze sobą skorelowane. Tym samym możliwe było bardziej syntetyczne podejście do analizy i interpretacji danych.

Pewną uwagę chciałabym odnieść do sposobu przedstawienia istotności wpływu czynników stresowych na zmiany poziomu badanych związków (metabolitów, transkryptu *ns-LTP2*, białka ns-LTP2) i na cechy fenotypowe. Zastosowano tu dwa testy wykrywające istotność różnic (test NIR Fishera i analizę kontrastów). Z jednej strony wzbogaca to materiał graficzny i pozwala zilustrować wyniki w bardzo przejrzysty sposób, ale jednocześnie stanowi powielenie informacji. Dodatkowo rodzi to problem polegający na uzyskaniu w niektórych przypadkach nieco odmiennych wyników, co jest zapewne skutkiem różnego poziomu rygorystyczności obu testów. Utrudnia to nieco interpretację rezultatów, warto byłoby zatem zdecydować się na prezentację jednego z dwóch testów.

Omówienie rozdziałów „Dyskusja” i „Podsumowanie i Wnioski”

Dyskusja świadczy o dużej dojrzałości naukowej mgr Michała Kempy i ukazuje Jego pasję do gruntownego zgłębiania wiedzy. W tym rozdziale dokładnie omówiono wyniki badań w odniesieniu do rezultatów już opublikowanych. Doktorant skrupulatnie przestudiował

niezwykle bogatą literaturę. Wielość i różnorodność badanych zagadnień wymagała bardzo szeroko zakrojonych studiów źródeł bibliograficznych, czego potwierdzeniem jest liczba zacytowanych prac. Autor umiejętnie i bardzo wnikliwie przeprowadził analizę własnych wyników na tle literatury. Ten rozdział wywarł na mnie szczególnie duże wrażenie.

Rozprawę kończy rozdział, w którym zawarto syntetyczne podsumowanie oraz dziewięć trafnych i dobrze sformułowanych wniosków.

UWAGI DO ROZPRAWY

Ogólna uwaga do pracy odnosi się do próby powiązania polimorfizmu genu *ns-LTP2* z poziomem lipidów oraz transkryptu i białka *ns-LTP2*. Moje zastrzeżenia wzbudziła próba dowiedzenia zależności między wariantem allelicznym genu *ns-LTP2* a zawartością lipidów oraz poziomem transkryptu genu *ns-LTP2*, bez wyraźnego pokrycia w wynikach.

W „Dyskusji” (str. 103) znalazło się stwierdzenie, iż „[...] wyższym ogólnym poziomem lipidów charakteryzowały się linie MPS37 (*ns-LTP2.a*) i MPW14/19 (*ns-LTP2.a*) w porównaniu z MPS106 (*ns-LTP2.b*) i MPW15/4 (*ns-LTP2.b*), co może przemawiać na korzyść genotypów z formą alleliczną *ns-LTP2.a*”. W wynikach trudno doszukać się potwierdzenia istotności statystycznej tej zależności; linia MPW14/19 nie tworzy odrębnej grupy jednorodnej względem MPS106 i MPW15/4.

Sugestię odnośnie zależności między wariantem allelicznym a poziomem transkryptu genu *ns-LTP2* zasygnalizowano w „Wynikach” (str. 69.): „u podstaw tej różnicy leżeć może działający wariant alleliczny” i rozwinięto w „Dyskusji” (str. 108): „Można przypuszczać, że wariant alleliczny genu *ns-LTP2* różni się sekwencją promotorową, co może wpływać na wydajność i sposób łączenia białkowych czynników transkrypcyjnych i formowanie kompleksu preinicjacyjnego transkrypcji, stanowiąc odzwierciedlenie w różnicach poziomu transkrypcji genu.”. Ta hipoteza może być prawdziwa, ale nie uważam, aby były podstawy do jej wysunięcia na podstawie uzyskanych wyników. Różnice w poziomie transkryptu w roślinach kontrolnych nie wykazywały związku z formą alleliczną genu *ns-LTP2*. Spośród sześciu linii o znanym wariacie allelicznym, linie MPS106 i MPW14/7 o stosunkowo dużym poziomie podobieństwa genetycznego i tym samym wariacie allelicznym (*b*) charakteryzowała największa różnica w poziomie transkryptu. Dwie inne linie pokrewne i podobne (MPW14/9 i MPW14/19), z wariantem allelicznym (*a*), także znacząco (ponad dwukrotnie) różniły się pod względem poziomu transkryptu. Te obserwacje zupełnie nie pozwalają na wysunięcie przypuszczenia, że analizowana zmiana strukturalna genu (SNP) przekłada się na wydajność transkrypcji.

Odniosłam wrażenie, że przez to, iż polimorfizm genu *ns-LTP2* został ujęty w tytule dysertacji, Doktorant czuł się zobligowany, aby wykazać związek wariantu allelicznego genu *ns-LTP2* z badanymi cechami. Prosty rozwiązaniem, aby pozbyć się tej presji byłaby korekta tematu, co w żadnym stopniu nie obniżyłoby wartości monografii.

PYTANIA DO DOKTORANTA

1. Polimorfizm genu *ns-LTP2* został wskazany jako istotny element charakteryzujący materiał badawczy, znajdując swoje miejsce w tytule rozprawy. Jednocześnie zabrakło informacji o wariantach allelicznych genu *ns-LTP2* w liniach RIL, co zawężyło możliwość interpretacji wyników odnośnie związku polimorfizmu tego genu z badanymi cechami. Zakładam, że Doktorant nie dysponował wiedzą na ten temat, ale proszę o skomentowanie tej uwagi i odpowiedź na pytanie, czy podjęto próby zmierzające do ustalenia form allelicznych genu *ns-LTP2* w liniach RIL.
2. W treści rozprawy pojawiło się przypuszczenie, że wariant alleliczny genu *ns-LTP2* może powodować różnice w poziomie transkrypcji genu. Proszę Doktoranta o przygotowanie wypowiedzi na temat możliwego sposobu lub sposobów weryfikacji tej sugestii.

PODSUMOWANIE

Praca Michała Kempy obejmowała bardzo szeroki zakres zagadnień i napisana została z niezwykłą starannością i biegłością typową dla doświadczonych badaczy. Na wszystkich etapach realizacji badań i przygotowania treści rozprawy Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością omawianej tematyki badawczej, dużymi umiejętnościami analitycznymi i dojrzałością naukową. Prowadzenie badań o tak złożonej tematyce i szerokim zakresie wiąże się często z koniecznością współdziałania z innymi naukowcami i zespołami badawczymi. Doktorant wykazał, że posiada umiejętność nawiązywania i prowadzenia współpracy zarówno z pracownikami rodzimej jednostki, jak też z innych instytucji.

Zasadniczym walorem pracy było kompleksowe i wielopoziomowe podejście do analizy wpływu stresów abiotycznych poprzez badanie zmian metabolomu i ekspresji genu *ns-LTP2* u różnych form jęczmienia jarego. Złożoność pracy wynikała z zastosowania wielu czynników zmiennych, poczynając od materiału badawczego (4, 8 lub 12 genotypów), poprzez różne fazy rozwojowe (rośliny dorosłe i zarodki), złożony układ doświadczalny (8 traktowań: kontrola, 3 stresy, 4 kombinacje; różne punkty czasowe analiz), liczne metody eksperymentalne z zakresu biologii molekularnej i chemii analitycznej aż do analizy danych z użyciem metod informatycznych i statystycznych.

Wartością pracy i wkładem do nauki jest znaczące poszerzenie dotychczasowej wiedzy i przedstawienie nowych odkryć dotyczących składu metabolitów i ekspresji genu *ns-LTP2* w warunkach trzech stresów abiotycznych i wykazanie odmiennych efektów czynników stresowych aplikowanych pojedynczo i łącznie na badane cechy.

WNIOSEK KOŃCOWY

Zgodnie z wymogami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Ustawa 2.0) rozprawa doktorska mgr. Michała Kempy przygotowana w formie monografii prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie „Rolnictwo i Ogrodnictwo”. Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pracę opiniuję pozytywnie, oceniając dysertację jako kompleksowe i wartościowe opracowanie zagadnienia wpływu stresów abiotycznych na metabolom i ekspresję genu *ns-LTP2* różnych form jęczmienia jarego.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr. Michała Kempy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 19 lutego 2023

Beata Myślik