Wrocław, 29.12.2024

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Wiktorii Koniecznej pt.

„Rola metalotionein owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe"

1. UZASADNIENIE WYKONANIA RECENZJI

Uchwałą nr 83, podjętą przez Radę Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w dniu 25 października 2024 r. w sprawie: wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej na podstawie art. 29 ust. 2 pkt 14 ustawy z 30 kwietni 2010 r. o instytutach badawczych (Dz. IJ. z 2022r., poz.498), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. Poz. 1669) oraz ustawą z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r., poz.1789) i Regulaminem Rady Naukowej - postanowiono o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Koniecznej. Rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki pod kierunkiem prof. dr hab. Grażyny Dąbrowskiej i dr Agnieszki Mierek-Adamskiej.

2. ZASADNOŚC WYBORU TEMATU ROZPRAWY

Zapotrzebowanie na owies zwyczajny w różnych gałęziach biogospodarki cieszy się aktualnie nieustającym popytem. Dawniej owies stanowił podstawę w żywieniu koni, a obecnie znajduje również powszechne zastosowanie w diecie ludzkiej z uwagi na swoje walory. Prozdrowotne wartości w diecie ludzkiej znane są od dawna i może on być spożywany w postaci ziarna, płatków owsianych, ziela owsa, mąki owsianej czy otrąb. Obecne w błonniku β-glukany są cenne dla osób mających problemy z przewodem pokarmowym. Zaleca się też stosować je dla celów profilaktycznych, dla uniknięcia tzw. chorób cywilizacyjnych takich jak: miażdżyca, otyłość, cukrzyca czy rak jelita grubego. Błonnik przyczynia się do obniżenia poziomu cholesterolu ogólnego we krwi. W medycynie ludowej napary oraz nalewki z ziela owsa stosuje się głównie przy bezsenności, osłabieniu nerwowym i wyczerpaniu na skutek depresji oraz sytuacji stresowych. Wyciągi z ziela owsa łagodzą i mogą zapobiegać uszkodzeniom wątroby. Dzięki flawonoidom i saponinom działają również moczopędnie. Związki saponinowe posiadają także właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwgrzybiczne. Odwar z ziela owsa (lub słomy owsianej), bogaty w rozpuszczalną krzemionkę, działa korzystnie w chorobach reumatycznych, kamicy nerkowej, schorzeniach nerek czy w chorobach skórnych. Uprawa owsa przed innymi roślinami zbożowymi jest

wskazana, gdyż należy on do gatunków fitosanitarnych. Większość upraw tego zboża zlokalizowane jest na półkuli północnej, pomiędzy 35 a 50 stopniem szerokości geograficznej. Zasięg uprawy owsa w krajach Europy dochodzi do północnych fiordów norweskich, a na południu do ujścia rzek francuskich, wpadających do Zatoki Baskijskiej. Roślina ta uprawiana jest również w Azji, Ameryce Północnej i Południowej, Australii i Nowej Zelandii. W górskich terenach uprawy sięgają wysokości 1000 m n.p.m., a powyżej 700 m n.p.m. jest jedynym uprawianym zbożem. W Polsce historia uprawy sięga VII-IX wieku, zaś hodowlę rozpoczęto pod koniec XIX wieku. Owies należy do roślin o niewielkich wymaganiach cieplnych, ale wysokich potrzebach wodnych, zwłaszcza w okresie wyrzucania wiech i kwitnienia - maj/czerwiec. Zachodzące intensywnie zmiany klimatyczne również w naszej strefie klimatycznej negatywnie wpływają na wzrost oraz plonowanie roślin, w tym owsa. Na skutek globalnego ocieplenia coraz częściej dochodzi do okresów niedostatku wody w newralgicznych fazach rozwojowych dla roślin, a na to wszystko nakłada się obecność metali ciężkich w glebie i działanie stresów biotycznych. Z uwagi na cenne właściwości owsa należy propagować jego uprawę, ale aby osiągnąć właściwy postęp hodowlany musi być to poprzedzone odpowiednio ukierunkowanymi pracami genetyczno-hodowlanymi dla sprostania potrzebom rynku. **W związku z powyższym stwierdzam, że Doktorantka podjęła badania ważne i istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia zmierzające do zidentyfikowania genów *MT* owsa *Avena sativa* L. (*AsMT*) i określenie roli kodowanych przez nie białek w reakcji owsa na czynniki abiotyczne (stres suszy, stres osmotyczny, metale ciężkie) oraz biotyczne (obecność grzybów *Trichoderma viride*).**

3. Ocena formalna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Koniecznej obejmuje polskojęzyczne opracowanie wraz ze streszczeniami w języku polskim i angielskim, skróty używanymi w tekście oraz odbitki czterech recenzowanych anglojęzycznych artykułów bez dołączonych oświadczeń współautorów. Prezentowane w dysertacji wyniki zamieszczone są w cyklu czterech spójnych tematycznie, wieloautorskich publikacjach, które ukazały się w latach 2023-2024:

1. Konieczna W., Mierek-Adamska A., Warchoł M., Skrzypek E., i Dąbrowska G. B. The involvement of metallothioneins and stress markers in response to osmotic stress in *Avena sativa* L. Journal of Agronomy and Crop Science, 2023, 209(3), 371-389. doi.org/10.1111/jac.12633, IF: 3,7, IF5-year: 4,0, MNiSW: 140
2. Konieczna W., Warchoł M., Mierek-Adamska A., Skrzypek E., Waligórski P., Piernik A., i Dąbrowska G. B. Changes in physio-biochemical parameters and expression of metallothioneins in *Avena sativa* L. in response to drought. Scientific Reports, 2023, 13(1), 2486. doi.org/10.1038/s41598-023-29394-2, IF: 3,8, IF5-year: 4,3, MNiSW: 140
3. Konieczna W., Mierek-Adamska A., Chojnacka N., Antoszewski M., Szydłowska-Czerniak A. i Dąbrowska G. B. Characterization of the metallothionein gene family in *Avena sativa* L. and the gene expression during seed germination and heavy metal stress. Antioxidants, 2023, 12(10), 1865. doi.org/10.3390/antiox12101865, IF: 6,0 IF5-year: 6,7 MNiSW: 100

4. Konieczna W. Turkan S. Warchoł M. Skrzypek E. Dąbrowska G. B., i Mierek-Adamska A. The contribution of *Trichoderma viride* and metallothioneins in enhancing the seed quality of *Avena sativa* L. in Cd-contaminated soil. Foods, 2024, 13(15), 2469. doi.org/10.3390/foods13152469 IF: 4,7 IF5-year: 5,1 MNiSW: 100

Wyniki opublikowano w czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. impact factor IF) wynoszących od 4,0 do 6,7 a punktacja wg MEiN waha się od 100 do 140 punktów. Łączny IF IF5-year w/w prac wynosi 20,1, zaś sumaryczna liczba punktów wg MNiSW i MEiN osiągnęła 480 pkt., co świadczy o wysokim poziomie naukowym prac wchodzących w skład osiągnięcia i zostało pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów czasopism. W czterech pracach Pani mgr Wiktoria Konieczna jest pierwszym autorem. Biorąc pod uwagę wymóg formalny oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji (Dz.U.2014 Poz. 1383; 6 ust. 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014) spełnia ona to kryterium. Według danych zamieszczonych w publikacjach wkład Doktorantki w powstanie czterech publikacji obejmował między innymi: udział w realizacji badań, interpretację oraz wizualizację wyników, współudział w pisaniu publikacji oraz korekcie w/w manuskryptów, co wskazuje na jej znaczący udział zarówno w prowadzonych badaniach jak również w powstawaniu końcowej wersji artykułów. Doktorantka współuczestniczyła również w pozyskaniu finansowania na część badań (Grants 4NCU Students I, VI). **Wyżej wymienione działania stanowią niewątpliwie o istotnym zaangażowaniu w prace badawcze osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora.**

Rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Koniecznej została podzielona na osiem tematycznych rozdziałów. Rozdziały zawierają: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstęp, cel badań, omówienie wyników i dyskusję, podsumowanie i wnioski, spis literatury, kopie publikacji będących podstawowym elementem osiągnięcia, informacje o finansowaniu badań w ramach projektów, dorobku Doktorantki, podziękowania oraz wykaz skrótów stosowanych w pracy. Tytuł pracy odpowiada tematyce publikacji będących przedmiotem osiągnięcia. **Całość dysertacji została właściwie przygotowana, a jej układ jest czytelny i zgodny z wymogami formalnymi wydań rozpraw doktorskich.**

4. Merytoryczna ocena pracy

Zredagowany przez Autorkę 'Wstęp' odzwierciedla celowość podjętych badań. Przedstawiony przegląd literatury został bogato poparty cytatami, a ilość źródeł literaturowych, na które powołuje się Doktorantka, wskazuje na bardzo dobrą znajomość bieżącej problematyki badawczej u wielu gatunków roślin w zakresie reakcji na stresy środowiskowe. W rozdziale tym Autorka podkreśla również istotność faktu zsekwencjonowania pełnego genomu owsa, dzięki czemu otworzyły się nowe możliwości badań genetycznych, które podjęła Doktorantka w swojej dysertacji. Sporo uwagi poświęca na wyszczególnienie stanu wiedzy na temat roli metalotionein w odpowiedzi na stresy wykazując znaczne braki w badaniach podstawowych u owsa w porównaniu do innych roślin użytkowych. W mojej ocenie dobór cytowanych prac do omawianych aspektów merytorycznych pracy jest właściwy. Autorka wykorzystała

najistotniejsze publikacje związane z tematem dysertacji, na które składają się artkuły zamieszczone w fachowych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. W dysertacji postawiono hipotezę badawczą, która zakładała, 'że MT to białka konserwowane ewolucyjnie, o potencjalnej roli w wielu procesach zachodzących w roślinach w tym we wzroście i rozwoju oraz odpowiedzi na stres'.

Doświadczenia realizowane w ramach poszczególnych etapów pracy wskazują na znaczną pracochłonność zarówno podczas ich realizacji jak i gromadzenia danych empirycznych. Autorka wyczerpująco w publikacjach przedstawiła opis metod i procedur badawczych. Również opis metod statystycznych do weryfikacji otrzymanych wyników został odpowiednio zredagowany. Do pozyskania materiału biologicznego w postaci roślin i przeprowadzenia poszczególnych eksperymentów posłużyły nasiona *A. sativa* L. cv. Bingo. **Jakimi przesłankami kierowano się przy wyborze akurat tej odmiany owsa do badań?**

W pierwszej części doświadczeń dotyczących weryfikacji, czy pMT i elementy układu obrony antyoksydacyjnej chronią owies przed stresem osmotycznym sprawdzono ekspresję genów *AsMT1-3* za pomocą qRT-PCR w korzeniach i pędach roślin owsa rosnących w kulturze hydroponicznej, po czterech dniach traktowania glikolem polietylenowym (PEG 6000) 180 g L−1 lub mannitolem w stężeniu 69 g L−1. **Dlaczego zastosowano takie dawki?** W niniejszej części zbadano również poziom związków fenolowych, cukrów rozpuszczalnych, kwasu abscysynowego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych przy użyciu metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych, co zdecydowanie uzupełniło wiedzę odnośnie uruchomionych mechanizmów w odpowiedzi analizowanego genotypu owsa na stres osmotyczny. Uzyskane wyniki pokazały, że ***AsMT1-3*** biorą aktywny, zróżnicowany udział w zależności od stresora o czym świadczy około pięciokrotnie i dziewięciokrotnie wyższa ilość transkryptu *AsMT3* w pędach i korzeniach w obecności mannitolu. Podczas stresu osmotycznego zawartość fenoli, cukrów rozpuszczalnych, kwasu abscysynowego oraz aktywność katalazy i peroksydazy w pędach wzrosła. W korzeniach traktowanych PEG 6000 ilość związków fenolowych była wyższa niż w korzeniach traktowanych mannitolem. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej była około 5-krotnie wyższa w korzeniach niż w pędach kilkudniowych siewek.

W kolejnym etapie pogłębiono analizy o zweryfikowanie roli roślinnych metalotionein u cv. Bingo w odpowiedzi na stres suszy. Został on wywołany przez zaprzestanie podlewania gleby, gdy rośliny osiągnęły stadium czterech liści. Stopień wilgotności gleby oznaczono metodą wagową na 70% polowej pojemności wodnej (FWC) w warunkach kontrolnych i 20% FWC w warunkach suszy. Po 14 dniach zebrano liście i korzenie roślin kontrolnych i poddanych działaniu suszy. W tym badaniu wykazano, że liczba i charakter elementów cis powiązanych z reakcją na stres w promotorach *AsMT1–3* różniły się w zależności od typu MT. Stres suszy w roślinach owsa spowodował wzrost ekspresji *AsMT2* i *AsMT3* oraz spadek ekspresji *AsMT1* w porównaniu z roślinami dobrze nawodnionymi. Ponadto niskim wartościom względnej zawartości wody, efektywności wykorzystania wody, netto fotosyntezy (PN), transpiracji (E), przewodnictwa szparkowego (gs), chlorofilu i karotenoidów towarzyszył wysoki poziom wycieku elektrolitów, wewnętrznemu stężeniu CO2 (Ci) i zawartości kwasu abscysynowego oraz wysokiej aktywności enzymów antyoksydacyjnych w roślinach poddanych stresowi suszy.

Uzyskane wyniki wskazały, że strukturalne różnice między typami roślinnych MT odzwierciedlają ich zróżnicowane role fizjologiczne. **Jak Doktorantka może wyjaśnić różnice w poziomie ekspresji analizowanych genów w pędach czy korzeniach pod wpływem stresu osmotycznego a suszy?**

W trzecim etapie założono między innymi, że metalotioneiny u owsa mogą być zaangażowane w odpowiedź na Zn i Cd, jednak ze zróżnicowaną ich rolą. W tym celu w wektor ekspresyjny wklonowano sekwencje kodujące *AsMT1-4*. Jak się okazało bakterie *E. coli* niosące geny *AsMT3* i *AsMT4* lepiej tolerowały obecność jonów Zn i Cd w środowisku, w porównaniu do bakterii zawierających pusty wektor ekspresyjny. Z kolei bakterie transformowane wektorem ekspresyjnym niosącym geny *AsMT1* i *AsMT2* namnażały się w podobnym tempie jak bakterie zawierające wektor ekspresyjny nie zawierający wstawki. Ponadto analiza sekwencji promotorów wykazała, że MT są związane ze szlakami metabolicznymi uruchamianymi w trakcie kiełkowania nasion. Wyniki qRT-PCR dowiodły, że wszystkie cztery typy AsMT podlegają zróżnocowanej ekspresji w ciągu pierwszych 48 godzin kiełkowania nasion. Ekspresja *AsMT1* w drugiej dobie kiełkowania była najwyższa zaś *AsMT2* w 6. i 12. godzinie kiełkowania. Ilość transkryptów *AsMT3* była najwyższa w suchych nasionach i w 48. godzinie kiełkowania, a genu *AsMT4* do 12 godzin. W kolejnych godzinach ilość transkryptów mRNA genu *AsMT4* zmalała, a na wysokim poziomie utrzymywało się mRNA *AsMT1-3*. Wysoka ekspresja genów *AsMT* w czasie kiełkowania sugeruje ich ważną rolę w tym procesie. **Jakie inne uwarunkowania genetyczne odgrywają istotną rolę w kiełkowaniu nasion?**

Interesującym aspektem, z uwagi na niewielką wiedzę na temat interakcji grzybów saprofitycznych z owsem, było określenie potencjalnego wpływu *T. viride* na wzrost roślin cv. Bingo *A. sativa* w doświadczeniu wazonowym, w tym podłożach skażonych Cd oraz udokumentowanie, że geny *AsMT1-4* biorą udział w interakcjach między roślinami a mikroorganizmami. Analiza ekspresji *AsMT1-3* u roślin potraktowanych zarodnikami *T. viride* w obecności najniżej dawki Cd (1 mg/kg gleby) była dwukrotnie wyższa w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi *T. viride*. Natomiast w wyższych stężeniach Cd (5, 10 i 20 mg/kg gleby) ekspresja w obu wariantach była na podobnym poziomie. W przypadku *AsMT4* ekspresja wzrastała po inokulacji sporami grzyba w roślinach rosnących w glebie zawierającej 10 mg Cd na kg gleby. Co ciekawe ekspresja tego genu negatywnie korelowała zarówno z inokulacją *T. viride* jaki i zawartością Cd w glebie i ekspresją pozostałych *AsMT*.

W kontekście uzyskanych wyników, czy widzi Doktorantka możliwość praktycznego wykorzystania zbóż, w tym owsa na terenach zdegradowanych? Jakie mechanizmy fitoremediacji byłyby najbardziej wskazane?

Reasumując podjęty zakres analizowanych genów w kontekście celu pracy jest konsekwentnie, wielowątkowo przebadany, a uzyskane wyniki dają szereg cennych informacji o roli metalotionein w procesach wzrostu oraz reakcji na czynniki abiotyczne i biotyczne. Reasumując rozdział 'Wyniki i dyskusja' zawiera syntetyczne omówienie wyników zaprezentowanych w cyklu czterech publikacji uwzględnionych w dysertacji. Ponadto w tym rozdziale zawarto elementy dyskusji. Doktorantka porównała rezultaty swoich badań z wynikami innych autorów i wyraźnie wskazała nowatorstwo badań. W interpretacji wyników

wykazuje również ostrożność. O dojrzałości naukowej w zakresie przeprowadzonych badań podstawowych i możliwości ich późniejszej implementacji do praktyki, w tym hodowlanej świadczy interesująco sformułowane podsumowanie oraz wyciągnięcie prawidłowych wniosków.

Do najważniejszych osiągnięć w ocenianej dysertacji zaliczam:

- Zidentyfikowanie 21 genów metalotionein, należących do czterech typów (AsMT1-4) oraz wykazanie, że promotory analizowanych genów *AsMT1-4* zawierają sekwencje regulatorowe powiązane z reakcję owsa na analizowane stresy: osmotyczny oraz suszy, a także wywołane metalami ciężkimi.

- Wykazanie dodatnich jak i ujemnych korelacji między ekspresją *AsMT1-4* a parametrami obrazującymi potencjał antyoksydacyjny roślin, co było też charakterystyczne dla części analizowanej rośliny i porównywanego parametru. Wskazuje to, że ekspresja *AsMT* jest regulowana przez kwas abscysynowy i metalotioneiny, co może być istotnym elementem systemu antyoksydacyjnego.

- Udokumentowanie, że analizowane geny *AsMT* zidentyfikowane u owsa wszystkich czterech typów mają wielorakie i uzupełniające się funkcje w czasie kiełkowania nasion.

- Dowiedzenie, że uprawa roślin cv. Bingo w obecności Cd nie wpływa negatywnie na wzrost, ale jednak powoduje spadek liczby nasion i jednocześnie wraz z rosnącymi stężeniami kadmu w glebie dochodzi do jego istotnej akumulacji w części nadziemnej owsa. Natomiast, co jest warte uwagi, inokulacja zarodnikami *T. viride* owsa oddziałuje pozytywnie na wzrost roślin i plonowanie cv. Bingo *A. sativa* i co ważne nie powoduje zwiększonej akumulacji zawartości Cd w roślinach.

- Potwierdzenie, że *E. coli* poprzez transformacje *AsMT1-4* w warunkach stresu wywołanego obecnością Zn i Cd oraz PEG i D-mannitolu wykazują zwiększone tempo wzrostu w porównaniu do bakterii transformowanych pustym wektorem ekspresyjnym. Badania wykazały istotny udział genu *AsMT2* w ochronie komórek bakteryjnych przed działaniem stresu osmotycznego a *AsMT3 i AsMT4* stresem wywołanym Zn i Cd.

5. Wniosek końcowy

Poddana ocenie rozprawa koncentruje się na istotnych zagadnieniach i stanowi interesujące wielowątkowe studium badawcze. Charakteryzuje się zarówno elementami poznawczymi jak i możliwościami ich wykorzystania w praktyce, w kontekście hodowli nowych odmian owsa. Autorka wykazała się umiejętnością powiązania rożnych metod badawczych podczas przeprowadzania doświadczeń, w tym z wykorzystaniem biologii molekularnej, a także stosowną interpretacją uzyskanych wyników dzięki zastosowaniu właściwych narzędzi statystycznych.
Ponadto należy zaznaczyć, że Doktorantka odbyła 2 staże naukowe - w Warwick University, Department of Chemistry, Coventry, Wielka Brytania oraz Instytucie Fizjologii Roślin im.

Franciszka Górskiego Państwowej Akademii Nauk w Krakowie. Prezentowała również wyniki badań na siedmiu konferencjach międzynarodowych i była wykonawcą w trzech projektach badawczych. Uzyskała też finansowanie pozwalające na udział w międzynarodowych konferencjach, stażach naukowych a także granty na realizację części prac badawczych (Grants 4NCU Students I i VI edycja). Jest też współautorem dwóch publikacji niebędących podstawą rozprawy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Wiktorii Koniecznej pt. „**Rola metalotionein owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe**" spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami DZ.U. z 2017 r. poz. 1789) uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postepowaniu o nadanie profesora (DZ.U. z 2018 r. poz. 261). **Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Wiktorii Koniecznej, ubiegającej się o stopień naukowy doktora, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

R. Galek

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni