

prof. dr hab. Piotr Masojć
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Yuliyi Kloc

pt. „Poznanie funkcji biologicznej genu *HvGSK* jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”

wykonanej w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB

w Radzikowie

1. Ocena formalna

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Inżynierii Genetycznej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- PIB w Radzikowie. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Wacław Orczyk, a promotorem pomocniczym dr Marta Dmochowska-Boguta. Rozprawa ma charakter monografii naukowej liczącej 126 stron. Jest podzielona na rozdziały pt.: Wprowadzenie, Przegląd literatury, Materiał, Metody, Wyniki i Dyskusja oraz Podsumowanie i wnioski. Ponadto zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury i objaśnienia skrótów. W rozdziałach zastosowano podział na podrozdziały, co znacznie podnosi przejrzystość pracy. Omówienie zagadnień i wyników pracy jest zaopatrzone w 36 rycin i 11 tabel, które w sposób jasny i logiczny ilustrują treści pracy. Są one wykonane bardzo starannie. Podobnie, duża staranność o kompleksowe opracowanie tematu charakteryzuje całą pracę. W pracy znajdują się odniesienia do bogatej literatury przedmiotu, tj. 172 pozycje cytowań, obejmujące najnowsze osiągnięcia nauki światowej w zakresie stosowanych nowoczesnych narzędzi i tematycznie związanych kierunków badawczych. Tekst pracy jest bardzo dobry, jasny i logiczny oraz dopracowany pod względem redakcyjnym, dzięki czemu odbiór pracy jest ułatwiony, pomimo iż przedstawia ona bardzo złożone, wysoce specjalistyczne i bogate pojęciowo zagadnienia naukowe oraz posiada bardzo rozbudowaną nowoczesną metodykę.

Podsumowując ocenę formalną pracy należy stwierdzić, że zawiera ona wszystkie niezbędne elementy rozprawy naukowej, pozwalające właściwie ocenić jej wartość merytoryczną i znaczenie dla nauki.

2. Ocena merytoryczna

Praca reprezentuje dyscyplinę agronomii w specjalności genetyka molekularna i inżynieria genetyczna roślin. Badany materiał roślinny to jęczmień uprawny, a więc bardzo istotna dla światowego rolnictwa roślina podlegająca ciągłemu doskonaleniu i selekcji coraz bardziej nowoczesnymi metodami hodowli. Jęczmień zajmuje także znaczącą pozycję w krajowej produkcji rolniczej. Praca stanowi próbę rozeznania możliwości zastosowania nowoczesnych narzędzi inżynierii genetycznej dla wskazania nowych kierunków i strategii poprawy wartości gospodarczej jęczmienia jarego w zakresie odporności na stres zasolenia, plonowania i parametrów morfologicznych.

Obiektem badań jest gen *HvGSK1.1* kodujący białko kinazę syntazy glikogenu i będący głównym negatywnym regulatorem sygnału rozwojowego płynącego od grupy fitohormonów brassinosteroidów (BR). Opierając się na analizie prac opublikowanych w literaturze światowej, a szczególnie na wynikach wcześniejszych badań przeprowadzonych u *Arabidopsis*, ryżu i jęczmienia, postawiono na wstępie pracy bardzo jasną i uzasadnioną hipotezę badawczą, iż wyciszenie badanego genu skutkowało powinno zwiększeniem biomasy i tolerancji jęczmienia na zasolenie. Cel pracy został również bardzo precyzyjnie określony jako wykazanie stopnia uzależnienia: tolerancji na zasolenie i cech użytkowych jęczmienia od aktywności wspomnianego genu. Cała praca i jej poszczególne etapy są konsekwentnie podporządkowane rzetelnej i metodycznej realizacji tego bardzo ambitnego celu. Przegląd literatury bardzo starannie wprowadza w zagadnienie jakie obejmuje praca doktorska. Doktorantka przedstawia w nim rolę brassinosteroidów w kształtowaniu cech rozwojowych roślin, charakteryzuje szczegółowo molekularny mechanizm ścieżki sygnałowej tych fitohormonów oraz przedstawia znaczenie i strukturę rodziny genów *GSK* u jęczmienia będących głównym obiektem badań. Należy zwrócić uwagę na fakt iż charakterystykę sekwencji genów *HvGSK* i ich ekspresji wykonano w macierzystym Zakładzie Inżynierii Genetycznej, przy znaczącym udziale Doktorantki (Groszyk i in. 2018). Równie precyzyjnie przedstawiono w przeglądzie literatury nowoczesne metody badawcze inżynierii genetycznej, pozwalające na wyciszenie i redagowanie genów, oparte o stosunkowo niedawno odkryte mechanizmy molekularne interferencji RNA (RNAi) oraz CRISPR.

O dużej skali przeprowadzonych prac świadczy bardzo duża złożoność zastosowanych materiałów i metod badawczych dokładnie i jasno omówionych na 21 stronach. Podejście do rozwiązania tematu badawczego jest bardzo ambitne, gdyż zastosowano dwie nowoczesne technologie wyciszania genów wykorzystujące mechanizm interferencji RNA (RNAi) oraz ukierunkowanej mutagenezy i edytowania genomu (CRISPR/Cas9). Na materiały składają się odmiana Golden Promise i linie transgeniczne jęczmienia jarego, szczepy bakteryjne użyte do transformacji i klonowania, plazmidy, media do kultur *in vitro* roślin, uprawy hydroponicznej, media do kultur bakteryjnych, startery użyte do PCR i oligonukleotydy użyte jako guide RNA. Wszystkie materiały są szczegółowo opisane, w tym w formie tabel; z podaniem niezbędnych sekwencji. W części Metody zawarty jest szczegółowy opis ogółem 37 zastosowanych metod i procedur badawczych z zakresu genetyki molekularnej, inżynierii genetycznej i kultur *in vitro* oraz zasady pomiaru cech roślin takich jak biomasa 14-dniowych siewek, względna zawartość wody, kąt nachylenia liścia. Opisano też zasady opracowania statystycznego wyników, które nie budzą wątpliwości.

Wyniki pracy są opisane na 31 stronach w sposób bardzo szczegółowy i uporządkowany, przez co powstaje starannie udokumentowany obraz doświadczalnych efektów założonych eksperymentów. Zarówno tabele jak i ryciny są prezentowane w sposób jasny, nie budzący wątpliwości interpretacyjnych. Interpretacja uzyskanych wyników przedstawiona w ich opisie jest właściwa. Wyniki są jednoznaczne, sugerują istotny pozytywny wpływ wyciszenia genu *HvGSK1.1* na parametry plonotwórcze jak: biomasa roślin w fazie siewki, wielkość ziarniaków, masa tysiąca ziarniaków, uwodnienie tkanki liścia, długość liścia flagowego oraz na większą odporność na zasolenie. Duże znaczenie wyciszenia genu *HvGSK1.1* dla zwiększenia sygnału ścieżki oddziaływania brassinosteroidów na rozwój rośliny pokazało także doświadczenie wykazujące wzrost kąta odchylenia liścia od pionu. Potwierdziło ono tym samym wyniki doświadczeń z analogicznym genem wykonanych na ryżu. Interesującym dopełnieniem obrazu roli genu *HvGSK1.1* było oznaczenie ekspresji jego paralogów z tej samej rodziny genowej w liniach transgenicznych i skorelowanie jej z biomasa siewek i masą tysiąca ziarniaków. Zaobserwowane skorelowanie ekspresji paralogów wyjaśniono działaniem odrębnego mechanizmu regulacji genetycznej, wykluczając jednocześnie bezpośredni wpływ kasety wyciszającej na te geny ze względu na różnicę w ich sekwencji. Jest to oczywiście możliwa interpretacja, lecz wymaga ona dodatkowych dowodów eksperymentalnych. Natomiast bardzo wyraźnie wykazano ujemną korelację ekspresji genów *HvGSK* z biomasa, masą tysiąca ziarniaków i względną zawartością wody.

W pracy podjęto także próbę ukierunkowanej mutagenyzy w obrębie genu *HvGSK1.1* przy pomocy systemu CRISPR/Cas9. W tym celu do odpowiedniego wektora CRISPR/Cas9 wprowadzono edytowany fragment sekwencji eksonu piątego genu *HvGSK1.1* i potwierdzono jej obecność w transformowanych bakteriami *E. coli.*, stosując reakcję PCR. Zweryfikowany plazmid wprowadzono do odpowiedniego szczepu *Agrobacterium tumefaciens* i przeprowadzono transformację niedojrzałych zarodków jęczmienia w liczbie 1800 tarczek zarodkowych, które poddano regeneracji w kulturze *in vitro*. Uzyskano 57 roślin T_0 z odrębnych zarodków somatycznych, z czego 50 zidentyfikowano jako rośliny transgeniczne. Wśród roślin T_0 zidentyfikowano 5 roślin homozygotycznych z mutacją, 14 roślin heterozygotycznych i 10 roślin biallelicznych lub o charakterze chimer. Do analizy sekwencyjnej metodą NGS wybrano potomstwo T_1 rośliny #VIII8 zidentyfikowanej jako bialleliczna lub chimera. W 66 roślinach T_1 na 88 badanych uzyskano potwierdzenie istnienia mutacji wygenerowanej metodą CRISPR/Cas9. Większość mutacji to delecje lub insercje skutkujące zmianą ramki odczytu i przedwczesnym kodonem stop, a więc wyłączeniem genu *HvGSK1.1* z funkcjonowania. Pełna charakterystyka sekwencyjna mutantów T_1 potwierdziła ich zróżnicowany charakter oraz wykazała iż kasetą CRISPR/Cas9 w pierwotnych mutantach może generować dalsze zmiany mutacyjne w następnych pokoleniach. Przeprowadzone badania stwarzają okazję do zapoznania się z mechanizmami molekularnymi zachodzącymi przy edycji genomu metodą CRISPR/Cas9 i to właśnie czyni z nich duże osiągnięcie naukowe. Potwierdzają także możliwość wyłączenia działalności genu *HvGSK*, czyli docelowy efekt tej metody stwarzający możliwość zwiększenia efektywności szlaku sygnałowego ze strony brassinosteroidów, a tym samym podwyższający parametry rozwojowe jęczmienia w warunkach normalnych i w warunkach zasolenia.

Dyskusja wyników została słusznie podzielona na podrozdziały odpowiadające poszczególnym zagadnieniom, przez co omawiane treści są dobrze uporządkowane. Autorka podkreśliła w wielu miejscach zgodność uzyskanych przez nią wyników z danymi literaturowymi odnoszącymi się

głównie do ryżu. Wskazała, iż uzyskane wyniki potwierdzają słuszność hipotezy badawczej zawartej we wstępie pracy. Widać także wyraźnie, że uzyskane wyniki oraz zastosowane metody doprowadziły do osiągnięcia założonego celu pracy i okazały się wynikami wysoce pozytywnymi. Do części tekstu Dyskusji zawartej na stronach 105-107 mam zasadniczą uwagę techniczną. Reprezentuje on raczej omówienie wyników aniżeli Dyskusję i stąd powinien być zamieszczony w poprzedzającym rozdziale.

W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” znajdujemy 13 konstatacji, które dobrze i wyczerpująco podkreślają znaczenie i wymowę osiągniętych wyników.

Z obowiązku recenzenta mam kilka uwag i pytań do Autorki Rozprawy.

1. Nazwa enzymu, którego kodujący gen był badany, sugeruje jego jeszcze inne role w roślinie niż ta, będąca w zainteresowaniu Autorki. Czy istnieje wiedza o jego innym znaczeniu?
2. Uproszczony pogląd na edytowanie genu metodą CRISPR/Cas9 zakłada utworzenie w nakierowanym miejscu ściśle określonej zmiany w sekwencji DNA. Wyniki pracy pokazują, że mamy do czynienia ze zróżnicowanymi zmianami w badanym odcinku genu oraz generowaniem kolejnych mutacji w następnych pokoleniach. Jak widzi Pani ten problem w aspekcie zastosowań praktycznych tej metody?
3. Proszę o porównanie perspektyw zastosowań w praktyce hodowlanej roślin uprawnych metod RNAi i CRISPR/Cas9.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Yuliyi Kloc spełnia pod względem formalnym i merytorycznym wymogi dotyczące rozpraw doktorskich według ustawy 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) oraz w związku 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)

Oceniana rozprawa doktorska stanowi bardzo cenne naukowo opracowanie ważnego dla dyscypliny agronomii, zagadnienia jakim jest znalezienie nowych podstaw genetycznych doskonalenia roślin uprawnych. W swojej pracy Doktorantka wykazała duże umiejętności warsztatowe w dziedzinie nauk rolniczych - stosowania różnorodnych metod inżynierii genetycznej, kultur *in vitro* i genetyki molekularnej. Posługując się sprawnie tymi narzędziami nowoczesnej nauki otrzymała pozytywne wyniki, potwierdzające założoną hipotezę badawczą, które mogą wraz z otrzymanymi cennymi i unikatowymi materiałami roślinnymi stanowić bazę dalszych badań, a także doprowadzić do doskonalenia metod i materiałów badawczych.

Wnioskuje do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie o dopuszczenie mgr Yuliyi Kloc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na nowatorski charakter badań, wybitne walory poznawcze i opanowanie pełnego zakresu warsztatu naukowego w zakresie nowoczesnych metod inżynierii genetycznej roślin wnoszę do Rady Naukowej Instytutu o wyróżnienie mgr Yuliyi Kloc i jej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.


prof. dr hab. Piotr Masojć