

Katowice, 17.06.2023

Dr hab. Agnieszka Janiak, prof. UŚ
Zespół Genetyki i Genomiki Funkcjonalnej Roślin
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr inż. Bartosza Jabłońskiego pt.: „Rola wybranych genów *TaCKX* w regulacji rozwoju i produktywności pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, w Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie, pod kierunkiem pani promotor prof. dr hab. Anny Nadolskiej-Orczyk oraz pana dr inż. Sebastiana Gasparisa, jako promotora pomocniczego.

Na przedstawioną do recenzji pracę składają się trzy publikacje naukowe, opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* o wysokim IF = 6,2 (IF za 5 lat, do roku 2022):

1. Jabłoński B, Ogonowska H, Szala K, Bajguz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. Silencing of *TaCKX1* mediates expression of other *TaCKX* genes to increase yield parameters in wheat. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(13):4809. doi: 10.3390/ijms21134809.
2. Jablonski B, Szala K, Przyborowski M, Bajguz A, Chmur M, Gasparis S, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. *TaCKX2.2* genes coordinate expression of other *TaCKX* family members, regulate phytohormone content and yield-related traits of wheat. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(8):4142. doi: 10.3390/ijms22084142.
3. Jablonski B, Bajguz A, Bocian J, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. Genotype-dependent effect of silencing of *TaCKX1* and *TaCKX2* on phytohormone crosstalk and yield-related traits in wheat. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(21):11494. doi: 10.3390/ijms222111494.

W każdej z przedstawionych publikacji Doktorant jest pierwszym autorem, z 40% udziałem w ich powstaniu, polegającym na dopracowaniu metodologii badań, wykonaniu analiz, opracowaniu, analizie i interpretacji danych oraz wykonaniu rysunków.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały już zrecenzowane, zatem przedstawiona recenzja dotyczy przede wszystkim oceny formalnej rozprawy, spójności badań oraz tekstu autoreferatu rozprawy przygotowanego przez Doktoranta w języku polskim, stanowiącego syntezę przeprowadzonych badań.



Praca doktorska pana mgr inż. Bartosza Jabłońskiego składa się z następujących części:

- autoreferatu rozprawy obejmującego wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, hipotezę badawczą oraz cele, materiały i metody, najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań wraz z ich podsumowaniem i wnioskami oraz spis literatury;
- publikacji wchodzących w skład rozprawy wraz z oświadczeniami kandydata i współautorów o ich udziale merytorycznym.

W streszczeniach Doktorant w sposób syntetyczny, ale jednocześnie treściwy przedstawił cele i założenia prowadzonych eksperymentów, najważniejsze wyniki oraz wnioski. W tym miejscu muszę zaznaczyć, że w zaprezentowanej treści pojawiło się błędne stwierdzenie opisujące geny *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*, mówiące o ich 90% homologii. Sądzę, że Autor miał tutaj na myśli procent podobieństwa sekwencji kodujących, jako że pojęcie homologii odnosi się do wspólnego ewolucyjnego pochodzenia sekwencji, którego wielkości nie mierzymy i które należy odróżnić od podobieństwa sekwencji. W tym kontekście chciałabym także zapytać o zdanie, które pojawia się w pierwszej publikacji z 2020 roku, w dyskusji, podpunkt 3.1:

„It should be underlined that there is no homology between the sequence of *TaCKX1* used for silencing and sequences of other *TaCKX* genes tested”.

Czy chodzi w nim o różne pochodzenie ewolucyjne poszczególnych genów *TaCKX*, czy też takie sformułowanie jest również efektem powyższej pomyłki?

W rozdziale „Przegląd literatury” Doktorant przedstawił wprowadzenie do każdego z aspektów przygotowanej rozprawy: omówił pochodzenie i znaczenie agronomiczne pszenicy zwyczajnej, przedstawił najważniejsze aspekty zjawiska interferencji RNA, dość obszernie opisał cytokininy, ich budowę, metabolizm, transport oraz ich znaczenie biologiczne, a także scharakteryzował geny z rodziny oksydaz/dehydrogenaz cytokininowych (CKX) u zbóż, kodujące enzymy rozkładające cytokininy. Te dwie ostatnie części przeglądu literatury uważam za bardzo cenne wprowadzenie do przedstawionych badań, które w przejrzysty i kompleksowy sposób systematyzuje informacje o tej złożonej grupie regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, w świetle najnowszych doniesień literaturowych. Informacje zawarte w tych podrozdziałach świadczą także o bardzo dobrej orientacji Doktoranta w literaturze przedmiotu.

Z kolei czytając podrozdział dotyczący interferencji RNA zauważyłam, że pojęciem RNAi Doktorant obejmuje wszystkie zjawiska wyciszania RNA, w których biorą udział zarówno cząsteczki siRNA, jak i miRNA, traktując wyciszanie RNA oraz zjawisko RNAi jako synonimy. Takie rozumienie interferencji RNA jest spotykane w literaturze, wydaje mi się jednak, że nieco częściej rozgranicza się wyciszanie ekspresji genów za pośrednictwem miRNA od procesów interferencji RNA, do której włącza się głównie te zjawiska, w których pośredniczą cząsteczki siRNA. Prosiłabym Autora o ustosunkowanie się do tej kwestii i krótkiego wskazania różnic w mechanizmach wyciszania RNA, w których pośredniczą cząsteczki miRNA oraz siRNA.



W podrozdziale „Hipoteza badacza i cele prowadzonych badań” Doktorant założył, że wyciszenie genów *TaCKX1* oraz *TaCKX2* będzie skutkowało zmianami na różnych poziomach (molekularnym, fizjologicznym i fenotypowym), pozwalając na analizę funkcji tych genów u pszenicy. Aby zweryfikować te hipotezę, Autor postawił sobie trzy szczegółowe cele:

- określenie poziomu ekspresji genów wyciszanych oraz ich ko-ekspresję z innymi genami z rodziny *TaCKX*,
- scharakteryzowanie zawartości fitohormonów ze szczególnym uwzględnieniem cytokinin oraz analiza aktywności enzymu dehydrogenazy cytokininy w transformowanych i kontrolnych liniach pszenicy,
- ocena wpływu zmian w poziomach ekspresji *TaCKX*, enzymu CKX i fitohormonów na cechy plonotwórcze roślin.

W kontekście pierwszego celu badawczego, chciałabym zapytać o przyczynę wyboru do analizy ko-ekspresji grupy genów: *TaCKX2.2*, *TaCKX2.1*, *TaCKX5*, *TaCKX9* i *TaCKX11*. Czym kierowano się wybierając do analizy właśnie te, a nie inne geny z rodziny CKX? Czy startery, które zaprojektowano do analizy qPCR pozwalały na amplifikację wszystkich homeologów tych genów? I podobnie, dlaczego w kontekście genotypowo-zależnego wpływu wyciszania genów *TaCKX1* oraz *TaCKX2* zdecydowano się także na analizę ekspresji genu *TaNAC2-5A*? Czy jego nadekspresja wpływa na wielkość plonu w sposób bardziej istotny niż nadekspresja innych znanych czynników transkrypcyjnych? Czy może istnieją dane o regulacji ekspresji tego genu przez cytokininy?

W rozdziale „Materiały i metody” Autor w dość minimalistyczny sposób przedstawił najważniejsze elementy zastosowanej przez siebie metodologii, odsyłając czytelnika do odpowiednich części oryginalnych publikacji. Uważam, że jest to zabieg jak najbardziej uzasadniony, dzięki któremu uniknięto niepotrzebnych powtórzeń, szczególnie, że opis metod w każdej z publikacji jest wyczerpujący i, tam gdzie to konieczne, zaopatrzone w niezbędne odniesienia do protokołów opublikowanych we wcześniejszych pracach Zespołu naukowego pani profesor Anny Nadolskiej-Orczyk. Uważam także, że włączenie do badań dwóch różnych odmian pszenicy jarej, bezostnej Kontesy oraz ościstej Ostki Smolickiej, było bardzo trafnym posunięciem, pozwalającym na istotne poszerzenie kontekstu prowadzonych badań i późniejszą weryfikację prowadzonych analiz funkcjonalnych badanych genów.

W rozdziale „Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań” w sposób systematyczny zostały omówione rezultaty uzyskane w każdej z trzech publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Pierwsza praca, w której Doktorant koncentrował się na analizie linii pszenicy z wyciszonym genem *TaCKX1* wyprowadzonych dla odmiany Kontesa, pozwoliła na zaobserwowanie, że stopień wyciszenia ekspresji tego genu wpływał na sposób regulacji ekspresji innych genów z rodziny CKX. Ciekawym wynikiem była obserwacja podwyższonej ekspresji genów *TaCKX2.1* oraz *TaCKX2.2* w liniach z wyciszeniem genu *TaCKX1*. Zauważono również, że wyciszenie ekspresji *TaCKX1* wpływa na istotne zwiększenie poziomu aktywnych form *trans*- i *cis*-zeatyny w kłosach po 7 dniach od pylenia, choć ogólna aktywność enzymatyczna białek CKX była porównywalna u roślin kontrolnych i w liniach z wyciszeniem genu



TaCKX1. Stwierdzono także istotne korelacje między wielkością plonu, masą tysiąca ziaren oraz masą korzeni a poziomem ekspresji genów *TaCKX2.1* oraz *TaCKX11* w liniach z wyciszeniem *TaCKX1*, wskazując jednocześnie na ich antagonistyczne działanie względem zawartości aktywnych form *trans*- i *cis*-zeatyny oraz nieaktywnej formy glukozydu *cis*-zeatyny (cZOG) w kłosach pszenicy.

Druga publikacja skupiała się na analizie funkcjonalnej genów *TaCKX2* prowadzonej również z wykorzystaniem odmiany Kontesa. W badaniach tych odnotowano różnice fenotypowe u roślin w zależności od tego, który z genów: *TaCKX2.2.1* czy *TaCKX2.2.2* został wyciszony, co może wskazywać na różne funkcje tych dwóch genów. Zaobserwowano także, że silne wyciszenie genu *TaCKX2.2.2* koreluje pozytywnie z niektórymi cechami związanymi z plonem, szczególnie masą tysiąca ziaren, a także ze zwiększoną zawartością chlorofilu w liściu flagowym. Stwierdzono też podwyższenie zawartości wolnych cytokinin izoprenoidowych cZ, tZ i iP, choć, podobnie jak wcześniej, nie zauważono zmian w poziomie aktywności enzymów CKX.

W trzeciej pracy Doktorant przeprowadził analizę linii z wyciszoną ekspresją genów *TaCKX1* oraz *TaCKX2* u ościstej odmiany pszenicy Ostka Smolicka. Podobnie jak w przypadku analiz opartych o odmianę bezostną, także i w tych badaniach zauważono sprzężenie zwrotne w regulacji ekspresji tych genów: wyciszenie genu *TaCKX1* wpływało na wzrost ekspresji genu *TaCKX2* i odwrotnie, wyciszenie genu *TaCKX2* powodowało podwyższenie ekspresji genu *TaCKX1*, co jak wnioskuje Autor, prawdopodobnie przyczynia się do utrzymania aktywności enzymów CKX na stałym poziomie. Ciekawym wynikiem w tej pracy była identyfikacja w kłosach badanej odmiany nowej formy auksyny (kwasu fenylooctowego, PAA) oraz topolin, cytokinin aromatycznych, które nie występowały w odmianie bezostnej. Stwierdzono także różnice w zawartości innych fitohormonów między obiema odmianami. Ważnym wynikiem były obserwacje różnic w odpowiedzi fenotypowej obu odmian Kontesy i Ostki Smolickiej w zależności od wyciszenia genów *TaCKX1* i *TaCKX2*, przede wszystkim pod względem cech związanych z plonem. Świadczy to o bardziej złożonej regulacji molekularnej tych cech, na które poza genami kodującymi oksydazy/dehydrogenazy cytokinin, wpływają i inne geny stanowiące tło genetyczne badanych odmian.

W kontekście otrzymanych wyników, chciałabym prosić Doktoranta o rozwinięcie odpowiedzi na pytanie, jak można wyjaśnić brak różnic w aktywności enzymów CKX w różnych liniach z wyciszonymi genami *TaCKX1* oraz *TaCKX2*, pomimo obserwacji podwyższonego poziomu różnych form cytokinin – podwyższonego w zróżnicowany sposób w poszczególnych liniach badanych w pracy.

W ostatniej części autoreferatu „Podsumowanie i wnioski” Autor sformułował 10 konkluzji, które moim zdaniem trafnie podsumowują uzyskane wyniki. Mam drobne zastrzeżenia do brzmienia wniosku nr 2 mówiącego o przeciwstawnym działaniu genów *TaCKX2.1* oraz *TaCKX11*. Przydałoby się w nim dodać, czego dotyczyło działanie tych genów. Również wniosek nr 4 mógłby zostać doprecyzowany o informację, do jakich modeli regulacji cech plonotwórczych się on odnosi.



Z obowiązku recenzenta muszę też wskazać na nieliczne, ale obecne w pracy błędy stylistyczne lub edycyjne. Na stronie 12 pojawia się stwierdzenie: „jednonicowe cząsteczki siRNA, wykazujące homologię do DNA promotora, nakierowują na niego metylotransferazy DNA”. Myślę, że zamiast „homologii” trafniejszym i bardziej poprawnym słowem byłoby tutaj „powinowactwo”. W kilku miejscach pojawia się także pojęcie „eksprymowany” w kontekście ekspresji genów. Uważam, że lepiej jest posługiwać się tutaj słowami „ulega ekspresji”, „jest aktywny” lub ewentualnie „podlega represji”. Na stronie 23 zdanie: „Analizy ekspresji wykonane przez Chen i in. (Chen i in., 2020) na podstawie RNA-seq 35 homeologów *TaCKX* wykazały, (...)” sugeruje, że analiza RNA-Seq była naceLOWANA tylko na te 35 genów. ŚcisłejSzym byłoby raczej stwierdzenie, że „na podstawie analizy RNA-Seq zidentyfikowano 35 homeologów *TaCKX*”. Powyższe uwagi mają jednak charakter poboczny, nie wpływając na zasadniczą ocenę zaprezentowanej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, uważam, że przedłożona rozprawa stanowi wartościowy wkład w poznanie roli genów *TaCKX* w kształtowaniu cech plonotwórczych u pszenicy zwyczajnej, szczególnie że porusza ten temat w sposób pionierski dla badanego gatunku. Autor przeprowadził szeroką analizę wielu cech fenotypowych, analizę molekularną poziomu ekspresji genów i zgromadził dane o profilu zawartości różnych from cytokinin i innych fitohormonów w kłosach pszenicy, w kontekście wyciszenia genów *TaCKX1* i *TaCKX2*. Z przeprowadzonych badań wyłania się dość złożony obraz interakcji między wyciszonymi genami a innymi czynnikami z tej samej rodziny oraz składem różnych grup fitohormonów i ich wpływem na cechy ważne agronomicznie. Uważam, że Doktorant umiejętnie przeprowadził syntezę uzyskanych wyników, a przedstawione publikacje pozwalają jednocześnie na wgląd we wszystkie szczegóły poszczególnych interakcji opisywanych w przedstawionej rozprawie. Dzięki temu przygotowane przez Doktoranta prace są cennym materiałem źródłowym pozwalającym zrozumieć rolę genów *TaCKX1* i *TaCKX2* u pszenicy i wykorzystać tę wiedzę w tworzeniu wysokoplonujących ideotypów tego gatunku.

Uważam, że rozprawa przedłożona przez mgr inż. Bartosza Jabłońskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi art. 14 ust. 2 pkt. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.), a stopień doktora może być nadany w dziedzinie i dyscyplinie określonej w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. Zatem wnioskuję do Rady Naukowej IHAR-PIB o dalsze procedowanie przewodu doktorskiego.

dr hab. Agnieszka Janiak, prof. UŚ

