

Szczecin, 08.09.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Mgr inż. Karoliny Marii Szala

pt.: „Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)
związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym”

Recenzja rozprawy doktorskiej została wykonana na podstawie uchwały nr 1/XX/100 Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB) w Radzikowie z dnia 22 czerwca 2023 r., oraz pisma Dyrektora IHAR-PIB w Radzikowie Pana dr inż. Michała Rokickiego z dnia 3 lipca 2023 r., nr RN-001-94/2023.

Informacje o rozprawie doktorskiej i jej ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Szala została wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej IHAR-PIB w Radzikowie pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Anny Nadolskiej-Orczyk, przy wsparciu promotora pomocniczego dr Marty Dmochowskiej-Boguta. Rozprawę przygotowano w oparciu o przepisy ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z późn. zm.

Rozprawę doktorską stanowi zbiór trzech tematycznie powiązanych ze sobą artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych wykazanych na liście czasopism określonych przez ministra właściwego do spraw nauki. Cykl publikacji pod wspólnym tytułem: „Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym” poprzedzony jest rozdziałami: 1) streszczenie (zarówno w języku polskim jak i angielskim), 2) przegląd literatury, 3) cele przeprowadzonych badań i hipoteza naukowa, 4) omówienie wyników, 5) podsumowanie uzyskanych wyników, 6) obserwacje i wnioski, 7) spis literatury. Do rozprawy dołączono kopie publikacji wchodzących w jej skład oraz oświadczenia współautorów opisujące ich udział w opublikowanych pracach. Dodatkowo zestawiono wykaz

używanych skrótów i terminów. W skład zbioru stanowiącego rozprawę wchodzi następujące artykuły naukowe:

1. Ogonowska H., **Barchacka K. (obecnie Szala)**, Gasparis S., Jablonski B., Orczyk W., Dmochowska-Boguta M., Nadolska-Orczyk A. (2019) Specificity of expression of *TaCKX* family genes in developing plants of wheat and their co-operation within and among organs, Plos One 14 (4): e0214239; DOI 10.1371/journal.pone.0214239

IF₂₀₁₉ = 2,74

2. **Szala K.**, Ogonowska H., Lugowska B., Zmijewska B., Wyszynska R., Dmochowska-Boguta M., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2020) Different sets of *TaCKX* genes affect yield-related traits in wheat plants grown in a controlled environment and in field conditions, BMC Plant Biology, 20(1):496; DOI 10.1186/s12870-020-02713-9

IF₂₀₂₀ = 4,21

3. **Szala K.**, Dmochowska-Boguta M., Bocian J., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2023) Transgenerational paternal inheritance of *TaCKX* GFMs expression patterns indicate a way to select wheat lines with better parameters for yield-related traits, Int. J. Mol. Sci., 24, 8196; DOI <https://doi.org/10.3390/ijms24098196>

IF₂₀₂₃ = 6,21

Wszystkie trzy prace opublikowano w czasopismach naukowych posiadających znaczące współczynniki wpływu (ang. *Impact factor* IF) w zakresie od 2,74 do 6,21 w roku wydania. W pierwszym artykule Doktorantka jest drugim autorem (z siedmiu), a w kolejnych dwóch pracach pierwszym autorem. Wszyscy autorzy publikacji złożyli stosowne oświadczenia o zakresie wykonywanych prac oraz dodatkowo o procentowym zaangażowaniu w przygotowanie publikacji. Wkład Doktorantki w powstanie każdej z publikacji był znaczący i wynosił odpowiednio 30%, 44% i 44%. Z zestawienia oświadczeń Autorki wynika, że jej aktywność koncentrowała się początkowo na wykonywaniu prac badawczych obejmujących izolację RNA, syntezę cDNA i analizy qRT-PCR. Z czasem jej warsztat badawczy poszerzył się o analizy ekspresji genów, analizy statystyczne, opracowanie i modyfikację koncepcji prac, w tym metodyki i wyników, analizę i interpretację danych oraz udział w wizualizacji. Pragnę podkreślić, że tak właśnie powinna wyglądać droga rozwoju naukowego, każdego doktoranta. Od zdobycia umiejętności wykonywania podstawowych technik badawczych i formułowania roboczych koncepcji, poprzez uzyskanie biegłości z technikami zaawansowanymi, nabycie umiejętności analizy i interpretacji wyników, aż po opracowywanie własnych koncepcji.

Przedstawione powyżej dane wskazują wyraźnie, że osoba ubiegająca się o nadanie stopnia doktora wykazała w rozprawie doktorskiej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska prezentuje stan wiedzy teoretycznej i wyniki badań w istotnej dla roślin grupie genów kodujących enzym oksydazę/dehydrogenazę cytokininy – CKX.

Tytuł rozprawy został trafnie dobrany i spaja cykl publikacji w całość tworząc podstawę do wyjaśnienia związku pomiędzy zróżnicowaną ekspresją genów kodujących cytokininy a zmiennością cech ilościowych pszenicy.

W przeglądzie literatury Doktorantka krótko scharakteryzowała obiekt badawczy tj. pszenicę ozimą i opisała jej znaczenie dla światowego rolnictwa. W dalszej kolejności zaprezentowane zostały podstawowe informacje o cytokininach, ich metabolizmie i funkcjach. Na uwagę zasługuje rys. 3 prezentujący model szlaku metabolizmu cytokinin u roślin, świetnie obrazujący jak złożony jest to mechanizm. Autorka szczegółowo opisała funkcjonalne geny CKX oraz kodowany przez nie enzym oksydazę/dehydrogenazę cytokininy, w tym zaprezentowała między innymi pozycje poszczególnych genów na chromosomach pszenicy. Znaczną część opisu zajmuje analiza funkcjonalna genów z rodziny CKX badanych u zbóż, a przede wszystkich tych występujących w pszenicy. W rozdziale tym omówiono również geny kodujące czynniki transkrypcyjne *TaNAC*, które mogą być ważnymi regulatorami dla cech plonotwórczych. W przeglądzie literatury poruszono także zagadnienia dziedziczenia epigenetycznego wraz z charakterystyką podstawowych mechanizmów odpowiedzialnych za ten typ zmienności. Całość tego rozdziału zamyka charakterystyka imprintingu wzoru ekspresji genów z charakterystyką dziedziczenia matczyngo i ojcowskiego. Zaprezentowany w tym rozdziale przegląd literatury oceniam bardzo wysoko. Pozwala on czytelnikowi zapoznać się z najistotniejszymi teoretycznymi zagadnieniami przedmiotowej rozprawy i pozwala zrozumieć opisywane dalej wyniki prac badawczych. Co więcej, stanowi bazę pozwalającą ocenić wkład naukowy Doktorantki w rozwój tego obszaru nauki. Pragnę dodać, że do opisu teoretycznego Autorka wykorzystowała 142 publikacje naukowe.

Analiza tego rozdziału oraz całej rozprawy uprawnia do stwierdzenia, że Kandydatka wykazała, iż posiada odpowiednią wiedzę teoretyczną w zakresie niezbędnym do zrozumienia złożoności realizowanej pracy naukowej w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Głównym celem badań jaki postawiła sobie Doktorantka było rozpoznanie puli genetycznej pszenicy i identyfikacja takich form, których podłoże genetyczne regulacji cytokinin wskazuje na zwiększony potencjał plonotwórczy z perspektywą wykorzystania tych genotypów w przyszłej selekcji. Sformułowane zostały dwa cele szczegółowe: 1) wskazanie znaczników molekularno-biochemicznych korelujących z gospodarką cytokinin i potencjałem plonotwórczym pszenicy oraz 2) użycie tych markerów do identyfikacji i selekcji form pszenicy o podwyższonej produktywności. Postawiona została również hipoteza badawcza, że geny z rodziny *TaCKX*, które wykazują wysoką ekspresję w rozwijających się kłosach, korzeniach, istotnie wpływają na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego.

Wyniki badań opublikowane w wymienionych wcześniej artykułach stanowiących osiągnięcie naukowe Kandydatka omówiła w rozdziale 6.

W pierwszej publikacji celem przeprowadzonych badań była ocena ekspresji 15 opisanych w literaturze genów *TaCKX*, analizowanej w różnych tkankach, terminach i stadiach rozwojowych roślin trzy odmian pszenicy. Wynikiem tych prac był podział genów na cztery grupy specyficzne tkankowo: liście, wszystkie tkanki, rozwijające się kłosa i kwiatostany oraz korzenie. Dodatkowo oszacowano różnice w poziomach ekspresji *TaCKX* w pierwszych i drugich kłosach, a także oceniano zależność poziomu ekspresji od pory dnia (godzina 9:00, 12:00 i 15:00). Stwierdzono istotne różnice w poziomach ekspresji zarówno w analizie kłosów pierwszych i drugich, jak również pomiędzy dzienną ekspresją dla badanych genów w odmianach. Wstępnie wytypowano dwie grupy genów pozytywnie wpływających na rozwój pszenicy, które mogą odegrać kluczową rolę w determinacji cech plonotwórczych. Dodatkowo w tab. 1 zaproponowano nową numerację genów *TaCKX*.

W drugiej publikacji sprawdzano zróżnicowanie w poziomie ekspresji genów *TaCKX* w 34 genotypach pszenicy, zarówno w kontrolowanych warunkach środowiskowych komory wzrostowej (fitotronu) jak i w polu (warunki środowiska niekontrolowane). Wykazano, że badane linie hodowlane znacznie różniły się poziomem ekspresji poszczególnych genów w zależności od środowiska wzrostu (fitotron/pole), przy czym różnice pomiędzy najniższą a najwyższą ekspresją obserwowano dla genu *TaCKX9* u genotypów uprawianych w fitotronie i były one ponad stukrotne. W warunkach polowych natomiast największe różnice, odpowiednio 275-krotne, w ekspresji obserwowano dla genu *TaCKX10*. Zgodnie z oczekiwaniami w przypadku niektórych genów nie stwierdzano istotnych statystycznie różnic w ich ekspresji w genotypach uprawianych w warunkach kontrolowanych i polowych. Sugeruje to możliwość wykorzystania pomiaru ekspresji genów u roślin rosnących w fitotronie (dotyczy kłosów) i użycie go jako markera potencjału plonotwórczego dla roślin uprawianych w

warunkach polowych. W pracy badano również koekspresję genów *TaCKX* i *NAC*, a dokładnie genu *TaNAC2-5A*, stwierdzając istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem ekspresji w korzeniu dla niektórych par genów a cechami fenotypowymi części nadziemnej roślin. Tu mam uwagę o charakterze ogólnym dotyczącą interpretacji związku pomiędzy poziomem ekspresji genów a cechami morfologicznymi przy wykorzystaniu współczynnika korelacji. Byłbym niezwykle ostrożny w uznawaniu istnienia takiego związku, jeśli współczynnik korelacji nie przekracza poziomu 0,5, nawet gdy stwierdzono istotną czy wysoce istotną korelację.

W publikacji trzeciej, moim zdaniem najważniejszej w niniejszej rozprawie, zbadano poziom ekspresji genów rodziny *TaCKX* oraz genu *TaNAC2-5A* w pięciu liniach hodowlanych oraz osiem potomstwach F₂ wyprowadzonych z roślin F₁ otrzymanych w wyniku krzyżowania w obie strony wybranych form rodzicielskich (w jednej kombinacji krzyżowania dana linia była raz matką a raz ojcem). W puli tych genotypów oceniono poziom ekspresji badanych genów w kłosach, 7 dni po kwitnieniu (DAP) i w korzeniach oraz cechy plonotwórcze. Celem tych prac było określenie, w jaki sposób dziedziczone są wzorce ekspresji tych genów, wraz z genem kodującym czynnik transkrypcyjny *TaNAC2-5A* oraz ich związek z cechami plonotwórczymi. Testy wykonano w kłosach 7 DAP i w korzeniach siewek rodziców oraz ich potomstw F₂. Niektóre pary lub grupy genów współpracowały ze sobą, a niektóre nie. Modele regulacji w górę lub w dół ekspresji genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A* dla kombinacji niskoplonujących roślin matecznych skrzyżowanych z wysokoplonującymi roślinami ojcowskimi, obserwowane w potomstwie F₂ wskazywały na odtwarzanie w nich ekspresji genów i produktywności komponentu ojcowskiego. Wytworzyło to pewien „układ architektury genetycznej“. Współczynniki korelacji między ekspresją genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A* a cechami związanymi z plonem u wysoce produktywnego potomstwa F₂ wskazywały, które z tych genów były specyficznie skorelowane z indywidualnymi cechami plonotwórczymi. Najczęściej stwierdzano istotną, dodatnią korelację ekspresji genu *TaCKX2.1* badanego w kłosach, z liczbą ziaren, masą ziarna, liczbą kłosów i długością kłosów oraz masą korzeni siewek. Co ciekawe poziomy ekspresji genów rodziny *TaCKX1* lub *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek były ujemnie skorelowane z cechami wymienionymi powyżej. Masa tysiąca ziaren (TKW) była obniżana przez geny *TaCKX2.2.2*, *TaCKX2.1* i *TaCKX10* badane w kłosach 7 DAP, ale dodatnio korelowała z ekspresją genów *TaCKX10* i *TaNAC2-5A* badanych w korzeniach siewek. Taki sposób przekazywania wzorców ekspresji genów rodziny *TaCKX* i *TaNAC2-5A* oraz cech związanych z wydajnością od rodziców do pokolenia F₂ wskazuje, zdaniem Autorki, na imprinting ojcowski.

W tym miejscu nie sposób nie odnieść się do zaprezentowanej w trzeciej pracy koncepcji imprintingu ojcowskiego. Jak Doktoranta słusznie zauważyła w przeglądzie literatury, jest to zjawisko niezwykle mało poznane, a jeśli już pojawiają się takie doniesienia to dotyczą one raczej imprintingu matecznego niż ojcowskiego oraz występującego głównie u diploidów. Oczywiście nie mogę zakwestionować, tego, że udało się odkryć takie zjawisko, ale potwierdzenie występowania tego fenomenu w pszenicy wymaga jeszcze wielu dodatkowych badań. Niezależnie jednak od tego czy imprinting ojcowski zostanie potwierdzony przez inne zespoły badawcze czy nie, to niewątpliwym sukcesem tej pracy jest opracowanie wzoru ekspresji genów rodziny *TaCKX* i jego powiązanie z cechami plonotwórczymi. Co więcej, te wzory można potraktować jako markery molekularne podnoszące poziom plonowania pszenicy, a po rozszerzeniu tych badań na inne gatunki również u pozostałych zbóż.

Uznaję wyniki tej pracy doktorskiej za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i ważny asumpt do wykorzystania tych wyników w przyszłej strategii selekcji wysokoplonujących odmian pszenicy.

W trakcie analizy rozprawy nasunęły mi się pewne uwagi i pytania:

1. W pracy wydzielono rozdział: „Wykaz używanych skrótów i terminów“. Myślę, że można było zrezygnować z tego rozdziału i wprowadzić wszystkie skróty i terminy w treść opracowania, szczególnie, że wyjaśnienie większości z nich znajduje się już w tekście.
2. Co do zasady uważam, że w pracach naukowych powinno się stosować formę bezosobową. Wprowadzanie formy osobowej np. pierwszej osoby liczby pojedynczej może być uzasadnione tylko w takim przypadku, gdy chcemy szczególnie podkreślić jakieś indywidualne osiągnięcie.
3. W metodyce publikacji nr 2 wskazano, że liczba genotypów użytych w analizach wynosiła 34, a w niniejszej rozprawie podano, że było to 60 obiektów. Proszę o wyjaśnienie rozbieżności.
4. W publikacji nr 3 nie znalazłem informacji czy badano ekspresję genów rodziny *TaCKX* i *TaNAC2-5A* w pokoleniu F₁. Taka analiza dostarczyłaby dodatkowych danych uwiarygadniających opisane w pracy wzory ekspresji genów.
5. Ile roślin pokolenia F₂ badano dla każdej kombinacji krzyżowania opisanej w publikacji nr 3?

6. Czy Pani zdaniem wykazane wzory ekspresji genów *TaCKX* powiązanych z produktywnością uwidocznione w pokoleniu F₂ będą stabilne w trakcie selekcji, w kolejnych latach programu hodowlanego?
7. Przyjmując, że wzory ekspresji wybranych genów *TaCKX* stałyby się markerami produktywności pszenicy jak mogłaby wyglądać strategia praktycznego ich wykorzystania w programach hodowlanych?

Na zakończenie pragnę zaznaczyć, że pewne braki czy drobne błędy stylistyczne nie wpływają na moją wysoką ocenę tej pracy. Nie widzę również żadnego powodu by poprawiać lub uzupełniać przygotowaną rozprawę.

Podsumowanie

Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **Pani mgr inż. Karoliny Szala pt.: „Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art.13 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), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), 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).

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Szala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

