

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Szala pt.
„Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)
związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym”**

Wprowadzenie

Pszenica zwyczajna (*Triticum aestivum* L.), obok ryżu i kukurydzy, jest jednym z trzech najważniejszych gatunków roślin uprawnych, światowa produkcja pszenicy wynosi obecnie około 780 mln ton i zapewne jest tylko kwestią czasu kiedy osiągnie 1 miliard ton. Ze względu na ogromne znaczenie gospodarcze pszenicy, zainteresowanie hodowlą tego gatunku stale wzrasta, a programy hodowlane są przede wszystkim ukierunkowane na uzyskiwanie odmian o większym plonie. Pszenica zwyczajna jest gatunkiem alloheksaploidalnym, charakteryzuje się złożonym genomem o wielkości około 17 miliardów par zasad, składającym się z trzech subgenomów A, B i D, co skutkuje tym, że geny występują w postaci subgenomowych homeologów. Wielkość i złożoność genomu pszenicy przez długi czas stanowiły wyzwanie dla badań genetycznych na poziomie molekularnym i ograniczały wykorzystanie metod biotechnologicznych w doskonaleniu pszenicy. Jednak w ostatnich latach, dzięki rozwojowi nowych technologii, a przede wszystkim dzięki zsekwencjonowaniu genomu pszenicy, otworzyły się zupełnie nowe możliwości badawcze i następuje szybki postęp poznawaniu genów o kluczowym znaczeniu dla hodowli.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Szala dotyczy genów *CKX*, kodujących oksydazy/dehydrogenazy cytokinin, enzymy nieodwracalnie degradujące cytokininy. Geny te dają możliwość ingerencji w homeostazę hormonalną na potrzeby poprawy cech plonotwórczych pszenicy, a więc ich poznanie ma duże znaczenie. Praca została wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie. Promotorem pracy jest Pani Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk, zaś promotorem pomocniczym Pani dr Marta Dmochowska-Boguta. Praca doskonale wpisuje się w główną tematykę badawczą tego zespołu i dzięki wcześniejszym pracom nad genami *CKX* u jęczmienia możliwe było bardzo dobre zaplanowanie badań nad tymi genami u pszenicy. Wykonana praca jest nowatorska, gdyż po raz pierwszy całościowo zbadano geny *CKX* występujące w alloheksaploidalnym genomie pszenicy. Wyniki uzyskane w ramach pracy mogą znaleźć zastosowanie podczas opracowywania nowych strategii hodowli pszenicy, zarówno opartych na modyfikacjach genetycznych, jak i wykorzystujących naturalną zmienność genetyczną.

Dane formalne rozprawy

Rozprawa doktorska jest zbiorem publikacji i składa się z trzech prac opublikowanych w uznanych pismach naukowych. Prace zostały opublikowane w latach 2019-2023 i wszystkie są w standardzie open access. Pierwsza praca została opublikowana w piśmie PLoS ONE (IF2019=2.74), druga w BMC Plant Biology (IF2020=4.215), zaś trzecia w International Journal of Molecular Sciences (IF2021=6.208). Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych publikacji jest równy 13,163. Doktorantka jest drugim Autorem w pierwszej pracy, w której zidentyfikowano geny *CKX* występujące w genomie pszenicy i zbadano profile ich ekspresji. Z oświadczeń współautorów wynika, że w tej pracy wkład Doktorantki był merytorycznie znaczący, był związany z analizą danych bioinformatycznych i wykonaniem analizy ekspresji genów, a więc analiz kluczowych dla publikacji i dalszych prac Doktorantki. Doktoranta jest pierwszym Autorem zarówno w drugiej jak i w trzeciej publikacji. Wkład Doktorantki w powstanie tych prac był wiodący i merytorycznie istotny. Doktorantka uczestniczyła w opracowaniu metodologii, wykonała większość badań, analizowała i interpretowała wyniki oraz uczestniczyła w opracowaniu wyników na potrzeby publikacji. Oświadczenia współautorów publikacji dołączone do rozprawy doktorskiej są zgodne z oświadczeniami Doktorantki.

Rozprawa, oprócz trzech publikacji, obejmuje: wykaz używanych skrótów i terminów, wykaz publikacji stanowiących rozprawę dokorską, streszczenia, przegląd literatury, zestawienie celów badań i hipotezę badawczą, omówienie i podsumowanie wyników, obserwacje i wnioski oraz spis literatury, w którym Autorka zamieściła 142 pozycje literaturowe i 3 źródła internetowe. Łącznie rozprawa liczy 150 stron. W rozprawie zamieszczono informacje, że badania były wykonane w ramach realizacji dwóch projektów kierowanych przez Promotora, projektu OPUS7 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki i zadania realizowanego w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi. Ponadto Doktorantka zamieściła oświadczenie o zmianie nazwiska w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Ocena rozprawy

W przeglądzie literatury Autorka przedstawiła syntetyczny zarys wiedzy związanej z problematyką badawczą pracy. W pierwszym podrozdziale w syntetyczny sposób omówiła znaczenie gospodarcze i strukturę genomu pszenicy. Drugi podrozdział jest znacznie bardziej rozbudowany. Autorka dokładnie przedstawiła funkcje i metabolizm cytokinin, wskazując na biotechnologiczny potencjał genów związanych z syntezą i degradacją tych hormonów. W kolejnej części przeglądu literatury, Autorka szczegółowo przedstawiła geny kodujące oksydazy/dehydrogenazy cytokinin (*CKX*), enzymy które nieodwracalnie degradują cytokininy, uwzględniając wcześniejsze badania przeprowadzone nad jęczmieniem i pszenicą. Autorka skupiła się przede wszystkim na roli genów *CKX* w regulacji plonowania oraz możliwości ich wykorzystania w celu poprawy plonowania, chociaż geny te mogą także uczestniczyć w kształtowaniu odpowiedzi na stresy i typu wzrostu roślin (przykładowo, u

ogórka mutacja w jednym z genów *CKX* skutkuje krzaczastym typem wzrostu roślin). Następnie Autorka ogólnie omówiła czynniki transkrypcyjne *NAC*, wskazując na czynnik *NAC2*, zaangażowany między innymi w zależną od cytokinin regulację ekspresji genów, którego nadekspresja prowadziła u ryżu do zwiększonej produktywności. W ostatniej części przeglądu literatury Doktorantka przedstawiła ogólnie poznane mechanizmy dziedziczenia epigenetycznego, bardziej szczegółowo omawiając piętnowanie rodzicielskie (ang. parental imprinting). Pomimo tego, że od wielu lat mechanizmy dziedziczenia epigenetycznego budzą olbrzymie zainteresowanie naukowców wciąż pozostają niewystarczająco poznane, szczególnie w przypadku poliploidalnych gatunków roślin.

Przegląd literatury jest napisany logicznie i stanowi dobre wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy. W zdecydowanej większości jest oparty o prace anglojęzyczne, opublikowane w uznanych pismach naukowych. Autorka pokazała w tym rozdziale, że jak dotychczas badania nad genami *CKX* i *NAC2* prowadzone były głównie dla gatunków posiadających stosunkowo proste genomy diploidalne, zaś badania nad tymi genami u pszenicy były fragmentaryczne i niepełne. To potwierdza, że w pełni uzasadnione było podjęcie kompleksowych prac badawczych nad tymi genami u pszenicy.

W kolejnym rozdziale rozprawy Doktorantka przedstawiła cel pracy, cele szczegółowe i hipotezę badawczą. Autorka zdefiniowała cel główny i dwa cele szczegółowe, które dotyczą wykorzystania potencjału genów *CKX* na potrzeby hodowli pszenicy. W rozdziale tym Autorka przedstawiła też hipotezę naukową, mówiącą o tym, że "geny z rodziny *CKX*, które wykazują wysoką ekspresję w rozwijających się kłosach i/lub systemie korzeniowym, istotnie wpływają na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego". Myślę, że hipoteza ta mogłaby być lepiej zredagowana, między innymi dlatego, że nie obejmuje badanego w pracy genu kodującego czynnik transkrypcyjny *NAC2*.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią trzy publikacje naukowe, które zostały opublikowane w uznanych pismach o międzynarodowym zasięgu. Prace te są spójne tematycznie i dostarczają nowej wiedzy na temat genów *CKX* i *NAC2* występujących u pszenicy. Autorka zawarła w rozprawie streszczenie tych publikacji i podsumowanie uzyskanych wyników.

Wykonana w pierwszym etapie badań "inventaryzacja" genów *CKX*, oparta o analizy bioinformatyczne bazujące na publicznie dostępnych zasobach genomicznych dla pszenicy, pozwoliła je pogrupować i ujednolicić ich nazewnictwo. Tu niezwykle przydatne okazało się doświadczenie zespołu w pracach nad genami *CKX* u jęczmienia. Następnie wykonana została analiza ekspresji genów *CKX* z wykorzystaniem metody RT-qPCR. Analizę tę wykonano dla wszystkich genów *CKX* dla trzech linii pszenicy. W oparciu o podobieństwo profili ekspresji Doktorantka wydzieliła cztery grupy genów *CKX*, ulegające specyficznej ekspresji w korzeniach, liściach, kwiatostanach i kłosach oraz we wszystkich badanych organach (publikacja 1). Profilowanie ekspresji i analizy statystyczne umożliwiły wskazanie genów związanych z potencjałem plonotwórczym do dalszych badań. Ponadto badania te

dostarczyły informacji, które pozwoliły dobrze zaplanować kolejne doświadczenia, przykładowo Doktorantka odnotowała wpływ godziny pobierania tkanki na ekspresję badanych genów i stwierdziła różnice pomiędzy trzema badanymi odmianami. Najważniejszymi wynikami tej części pracy było zbadanie ekspresji genów *CKX* w kontekście kształtowania cech plonotwórczych pszenicy. Wyniki analiz bioinformatycznych uległy dość szybko zweryfikowaniu w pracy Chen i in. (2020), co było następstwem aktualizacji baz danych z zasobami genomicznymi dla pszenicy.

W drugim etapie prac Doktorantka określiła i porównała wzory ekspresji 11 genów *CKX* dla 34 odmian i współczesnych linii hodowlanych pszenicy pochodzących z firm hodowlano-nasiennych. Dodatkowo, do badań włączony został gen *NAC2* (*TaNAC2-5A*), którego ekspresja u ryżu była związana z cechami plonotwórczymi i metabolizmem cytokinin. Analizy zostały wykonane nie tylko dla roślin rosnących w fitotronie, ale także dla roślin rosnących w polu, co jest bardzo cenne, gdyż pokazuje w jakim stopniu wyniki uzyskane w kontrolowanych warunkach fitotronowych pokrywają się z wynikami dla warunków polowych (publikacja 2). Dysponując dużym zbiorem danych Doktorantka mogła analizować profile ekspresji genów *CKX* i *NAC2* w powiązaniu z cechami plonotwórczymi i masą systemu korzeniowego oraz wskazać grupy genów ulegające koekspresji w obydwu środowiskach. Doktorantka pokazała, że poziom ekspresji badanych genów jest różny dla badanych odmian i linii hodowlanych, co oznacza, że na podstawie naturalnej zmienności profili ekspresji genów *CKX* i *NAC2* można tak dobierać formy rodzicielskie do krzyżowań, by poziom ekspresji tych genów w potomstwie zapewniał wysoką wartość cech plonotwórczych. Autorka stwierdziła też, że profile ekspresji badanych genów w warunkach fitotronowych są dla większości genów inne niż w warunkach polowych, ale zidentyfikowała takie, na których ekspresję warunki uprawy nie miały wpływu. Autorka postuluje, że na potrzeby selekcji takie geny mogą być testowane w warunkach fitotronowych. Ciekawym wynikiem było wskazanie, że profil ekspresji czynnika transkrypcyjnego *NAC2* jest podobny do profili niektórych genów *CKX* i powiązany z cechami fenotypowymi części nadziemnej rośliny. Pomimo złożoności wyników, Autorka opracowała modele ukazujące korelacje między profilami ekspresji genów *CKX* i *NAC2* oraz cechami plonotwórczymi. Wyniki tej części pracy, opublikowane przez Doktorantkę w drugiej publikacji, stanowią najważniejszą część rozprawy doktorskiej.

W trzecim i ostatnim etapie pracy Doktorantka wykorzystwała krzyżowania linii pszenicy o kontrastowych profilach ekspresji genów *CKX* i parametrach cech plonotwórczych oraz pokolenia F₂, aby zbadać sposób dziedziczenia tych profili. Krzyżowania roślin były wykonane dla czterech układów linii rodzicielskich w obydwu kierunkach. Autorka pobierała do analiz tkankę z linii rodzicielskich i pojedynczków F₂. Szkoda, że do analiz nie włączono roślin F₁. Analizy pokazały, że profile ekspresji genów *CKX* i *NAC2* są dziedziczne, przy czym dla wielu genów jak również cech plonotwórczych były dziedziczone jednorodzicielsko ojcowsko, a dla pojedynczych jednorodzicielsko matecznie. Autorka opracowała model łączący te profile z parametrami cech plonotwórczych, proponując metodykę selekcji w oparciu o profilowanie ekspresji genów *CKX* i *NAC2* w korzeniach i młodych kłosach na

potrzeby hodowli. Najciekawszym wynikiem tej części pracy jest wskazanie roli piętnowania rodzicielskiego w kształtowaniu potencjału plonotwórczego pszenicy. Jak dotychczas zjawisko to nie było opisywane dla pszenicy. W moim odczuciu wyniki te stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych badań, których celem byłoby poznanie mechanizmu piętnowania rodzicielskiego genów *CKX*.

W rozdziale zatytułowanym „Obserwacje i wnioski” Autorka rozprawy zaprezentowała kluczowe spostrzeżenia i wnioski, które zostały ujęte w dziesięciu punktach. Stwierdzenia zawarte w poszczególnych punktach są różnej wagi i w większości mają charakter biologiczny i są powiązane z celami pracy. Pojedyncze stwierdzenia mają charakter techniczny lub metodyczny, na przykład punkty 1 i 3. W moim odczuciu rozdział ten mógłby być lepiej przemyślany i tak zredagowany, żeby zawarte w nim były najważniejsze wnioski wynikające z wykonanych badań.

Podsumowując, uzyskane przez Doktorantkę wyniki są oryginalne i dostarczają nowej wiedzy na temat genów związanych z potencjałem plonotwórczym alloheksaploidalnej pszenicy. Doktorantka osiągnęła cel pracy i zweryfikowała postawioną hipotezę naukową, poznając zmienność ekspresji genów *CKX* i *NAC2* w szerokiej puli materiałów hodowlanych o różnym potencjale plonotwórczym. Należy podkreślić, że jest to pierwsza tak całościowo wykonana analiza ekspresji genów rodziny *CKX* i genu *NAC2* u pszenicy, a znaczenie badań potwierdza fakt, że publikacje 1 i 2 stanowiące rozprawę, były już cytowane odpowiednio 17 i 10 razy.

Uwagi do pracy

Wyniki przedstawione w ocenianej rozprawie były już pozytywnie zrecenzowane przez specjalistów. Mam jednak pewne pytania, związane z przedstawioną mi do recenzji rozprawą, które mają charakter dyskusyjny lub dotyczą szczegółów metodycznych.

1. Autorka zwraca uwagę na wpływ pory dnia na ekspresję genów *CKX*. Czy można przedstawić hipotezę, że rytm dobowy, określany w literaturze anglojęzycznej terminem „circadian clock”, reguluje transkrypcję genów *CKX*?
2. Szacuje się, że u człowieka około 230 genów ulega piętnowaniu rodzicielskiemu. Czy wiadomo, ile genów podlega piętnowaniu rodzicielskiemu u roślin, w następnie zapłodnienia komórki jajowej i rozwoju zarodkowego oraz zapłodnienia komórki centralnej woreczka zalążkowego i rozwoju endospermu?
3. W analizach RT-qPCR wyniki odnoszono do odmiany referencyjnej „Ostka”. Jakie były kryteria wyboru odmiany referencyjnej do analiz ekspresji badanych genów?

Mam też kilka uwag o charakterze stylistyczno-edytorskim. Uwagi te, w żadnym stopniu nie wpływają na moją pozytywną ocenę pracy.

1. Autorka pisze o "metabolizmie cytokininy". Czy wobec tego, że u roślin występują różne formy cytokinin, różniące się zarówno budową chemiczną jak i aktywnością biologiczną czy nie powinno się używać liczby mnogiej i pisać o "metabolizmie cytokinin"?
2. W punkcie 2 rozdziału "Obserwacje i Wnioski" Autorka stwierdza: „wykazano, że geny *TaCKX* są tkankowo- i rozwojowo specyficzne”. W moim odczuciu stwierdzenie to jest nieprecyzyjne, gdyż Autorka wyróżniła grupy genów ulegające specyficznej ekspresji w organach, takich jak: korzenie, liście, kwiatostany i kłosa.
3. W przypadku cytowania źródeł internetowych, Autorka podała link i datę wejścia na stronę. Uważam, że dla takich źródeł powinna być podana nazwa portalu, a źródło powinno być umieszczone w spisie literatury zgodnie z przyjętym porządkiem.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Szala dotyczy istotnej problematyki badawczej jaką jest poznanie roli genów związanych z metabolizmem cytokinin w kształtowaniu potencjał plonotwórczego alloheksaploidalnej pszenicy. Cel pracy został osiągnięty, a uzyskane wyniki są nowatorskie i w całości zostały opublikowane. Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Szala pt. „Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym” spełnia kryteria 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 trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie 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 mgr inż. Karoliny Szala do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski