

prof. dr hab. Piotr Masojć

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

71-434 Szczecin ul. Słowackiego 17

## Recenzja rozprawy habilitacyjnej i dorobku naukowego

dr Katarzyny Mikołajczyk

wykonana na zlecenie Rady Naukowej IHAR-PIB w Radzikowie

### Dane ogólne

Dr Katarzyna Mikołajczyk ukończyła studia na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, gdzie w roku 1986 uzyskała stopień magistra biologii w specjalności biologia molekularna broniąc pracę pt.: „Zmiany potencjału błonowego w mitochondriach *Ascaris suum* mierzone sondą fluorometryczną dis-C3-(5)”. Pracę dyplomową wykonała pod kierunkiem profesora Jana Michejdy. Pracując w Instytucie Chemii Bioorganicznej zrealizowała pracę doktorską pt.: „Charakterystyka cDNA kodującego białko rybosomalne P0 łubinu żółtego i jego ekspresja”, której promotorem był prof. Jan Barciszewski. W roku 1997 rozpoczęła pracę w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych Oddział w Poznaniu, kierowanym przez prof. Jana Krzymańskiego a następnie przez prof. Iwonę Bartkowiak-Brodę. Odbывała 5 zagranicznych czterotygodniowych staży badawczo-naukowych w takich ośrodkach jak Instytut Biologii Molekularnej Akademii Nauk ZSRR w Moskwie, Pracownia Genetyki Molekularnej w roku 1987, 1988, w Instytucie Maxa Plancka w Berlinie 1988 r., w Instytucie INRA we Francji w 1998 r. oraz w Instytucie Liebiga w Niemczech w 2005 roku. Uczestniczyła w 10 krajowych i 12 międzynarodowych konferencjach naukowych, gdzie prezentowała wyniki swoich badań w formie 20 plakatów i 8 referatów ustnych. Współpracuje naukowo z ośrodkami zagranicznymi i krajowymi jak INRA we Francji, Uniwersytetem im. Adama Mickiewicza (Pracownia Analiz Molekularnych, Pracownia Bioinformatyki), Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu (Katedra Metod Analizy Statystycznej), Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Instytutem Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

Uczestniczy w szkoleniu specjalistycznym studentów biotechnologii a także w szkoleniach dla hodowców. Opiekuje się jedną pracą doktorską i kieruje realizacją prac licencjackich studentów biologii.

Była kierownikiem grantu własnego KBN i dwóch tematów w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego. Bierze aktywny udział w organizacji nauki jako redaktor czasopisma Rośliny Oleiste- Oilseed Crops, członek Polskiego Towarzystwa genetycznego i współorganizator Konferencji naukowej Rośliny Oleiste- Oilseed Crops w 2012 roku w Poznaniu. W dowód uznania za swoją działalność naukowo-badawczą otrzymała nagrody Dyrektora IHAR w 2007 r., Odznakę

honorową „Zasłużony dla rolnictwa” nadaną przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2011 i wreszcie nagrodę zespołową Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w roku 2012 za opracowanie metody hodowli odmian mieszańcowych rzepaku, wspomaganej markerami molekularnymi.

Jej dorobek naukowy poza rozprawą habilitacyjną łączącą w sobie 7 publikacji oryginalnych to łącznie 36 publikacji naukowych w tym 8 prac oryginalnych w czasopismach indeksowanych. Wraz z dwoma patentami i wdrożeniami łączna punktacja dorobku dr Katarzyny Mikołajczak to według punktacji MNiSW 339 pkt, liczba łączna IF 9,38, sześć cytowań, indeks Hirscha 2.

## **Ocena rozprawy habilitacyjnej**

### Ocena formalna

Rozprawa habilitacyjna dr Katarzyny Mikołajczyk pt. „Markery genetyczne w programach hodowli rzepaku” liczy 119 stron i składa się z czterech rozdziałów oraz załączonych sześciu publikacji oryginalnych twórczych i jednej pracy przeglądowej. W pięciu załączonych pracach oryginalnych twórczych i w jednej przeglądowej habilitantka jest pierwszym autorem. W pierwszym krótkim rozdziale zatytułowanym „Problem badawczy” autorka wyjaśnia genezę tematyki badawczej swojej rozprawy. Rozdział drugi – Wstęp jest złożony z pięciu podrozdziałów i zawiera przegląd literatury związanej z charakterystyką składu kwasów tłuszczowych rzepaku, poświęconej badaniom nad generowaniem markerów molekularnych dla ważnych cech gospodarczych tej rośliny uprawnej. Ponadto w rozdziale tym przedstawiono cel i szczegółowe etapy prac badawczych z zakresu rozprawy habilitacyjnej oraz objaśnienia stosowanych skrótów. Trzeci rozdział to wykaz załączonych publikacji a w czwartym zamieszczona jest ich charakterystyka. Ponadto praca zawiera podsumowanie ujęte w ośmiu wnioskach, spis literatury liczący 77 pozycji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

Załączone publikacje stanowią cykl monograficzny prac poświęconych tematowi generowania markerów molekularnych dla rolniczo-użytkowych cech rzepaku takich jak cytoplazmatyczna męska sterylność i zdolność odtwarzania płodności męskiej (geny restorery) niezbędne dla prowadzenia hodowli odmian mieszańcowych oraz niska zawartość kwasu linolenowego sprzyjająca trwałości technologicznej oleju rzepakowego. Prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych jak Plant Breeding – trzy z prac, Journal of Applied Genetics – jedna praca, oraz w periodyku wydawanym w kraju pt. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops – trzy prace. Oświadczenia poszczególnych współautorów publikacji załączone w materiałach potwierdzają, iż dr Katarzyna Mikołajczyk była główną autorką tekstu tych publikacji oraz wykonawcą przeważającej części prac badawczych.

### Ocena merytoryczna

Współczesne odmiany rzepaku wykorzystują zjawisko heterozji dla intensyfikacji produkcji oraz podnoszą jakość produktu jakim jest olej poprzez dobór odpowiedniego składu kwasów tłuszczowych. Krajowa hodowla ma duże osiągnięcia a w tych kierunkach a zawdzięcza to między

innymi współpracy z genetykami, którzy tak jak dr Katarzyna Mikołajczyk dostarczają jej nowoczesnych narzędzi w formie specyficznych markerów molekularnych dla prowadzenia selekcji korzystnych genotypów. Ta symbioza genetyków i hodowców wygenerowała nowy dział hodowli zwany hodowlą molekularną, który gwałtownie rozwija się na świecie i zaczyna także kiełkować w naszym kraju. Dr Katarzyna Mikołajczyk jest jednym z nielicznych genetyków krajowych, którym udało się doprowadzić do wdrożenia wyników swoich żmudnych badań laboratoryjnych do praktyki hodowlanej. Rozprawa habilitacyjna bardzo dokładnie prezentuje tę drogę jaką trzeba przejść aby wyodrębnić właściwy fragment DNA i metodę jego identyfikacji, jako niezawodny test na obecność korzystnej cechy użytkowej w materiale hodowlanym.

Pierwszy etap prac polegał na dopracowaniu metody izolacji DNA z tkanki rzepaku, gwarantującej powtarzalność wyników w dalszych badaniach. Najlepsze wyniki dała modyfikacja metody Doyle i Doyle'a (1990) polegająca na zastąpieniu homogenizacji w ciekłym azocie homogenizacją w buforze przemywającym. Stwierdzono przy tym, że tkanka młodych liści rzepaku najlepiej nadaje się do otrzymywania powtarzalnych izolacji DNA. Prace opisane w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy habilitacyjnej obejmowały optymalizację metody reakcji PCR dla otrzymania powtarzalnych obrazów jednoprzążkowych markera SCAR identyfikującego męskosterylną cytoplazmę typu ogura, poprzez namierzanie polimorfizmu w genie mitochondrialnym orf138. Marker ten rozdzielany zgodnie z danymi literaturowymi dawał obraz wieloprzążkowy co utrudniało jego wykorzystanie w pracach selekcyjnych. Eksperymenty zmieniające warunki reakcji PCR doprowadziły do opracowania przez autorkę metody otrzymywania specyficznych obrazów markera SCAR w postaci jednego, wyraźnego prążka dla cytoplazmy sterylizującej pyłek i braku jakichkolwiek prążków – forma null, dla cytoplazmy niesterylizującej. Jak wiadomo w systemie cytoplazmatycznej męskiej sterylności w kształtowaniu płodności/sterylności pyłku współpracują geny cytoplazmatyczne i geny jądrowe, stąd aby w pełni kontrolować cechę płodności konieczne było opracowanie markera dla genu restorera *Rfo*. W literaturze opisany był marker typu RAPD sprzężony z genem restorera, jednak ze względu na dawanie obrazu wieloprzążkowego, niespecyficznego nie nadawał się on do celów praktyki hodowlanej. W pracach opisanych w publikacji drugiej dr Katarzyna Mikołajczyk dokonała izolacji fragmentu RAPD z żelu a następnie jego klonowania i sekwencjonowania. Na podstawie sekwencji zaprojektowano parę starterów, które amplifikowały jeden specyficzny produkt – marker SCAR identyfikujący allel restorera płodności, co potwierdzono na próbie 220 linii restorerowych i płodnych mieszańców F1. Zakończona sukcesem konwersja wysoce niedoskonałego markera RAPD na marker specyficzny SCAR stworzyła nowe narzędzie dla selekcji komponentów do hodowli mieszańcowej rzepaku, co niewątpliwie jest dużym osiągnięciem naukowym i aplikacyjnym habilitantki. Opracowała ona system dwóch specyficznych markerów – jednego identyfikującego gen cytoplazmatyczny i drugiego identyfikującego gen jądrowy współpracujące w wytworzeniu męskiej sterylności/płodności roślin rzepaku. Ponieważ każdy z tych markerów identyfikowany był w odrębnym teście co nie było korzystne z punktu widzenia koszt- i pracochłonności prowadzenia selekcji w oparciu o te markery, dr Katarzyna Mikołajczyk podjęła się realizacji następnego kroku w kierunku zoptymalizowania metody selekcji. Wyniki tego etapu prac habilitantki opisuje trzecia publikacja, której celem było opracowanie wielokrotnego PCR dla równoczesnej detekcji obu markerów specyficznych na jednym żelu. Nie jest to zadanie łatwe gdyż zachodzi tu konieczność dobrania warunków reakcji PCR oraz sekwencji minimum dwóch par starterów tak by powstawały niezależne dwa produkty PCR o wyraźnie różniących się długościach. Cel ten osiągnięto. Opracowany system oprócz produktów dla genu *Rfo* i genu mitochondrialnego

amplifikował trzeci gen aktywny dający prążek referencyjny do eliminowania przypadków fałszywych nulli mogących powstawać na skutek błędów technicznych. Tak dopracowany system selekcji z użyciem markerów można więc uznać za wzorcowo zrealizowane zadanie badawcze dostarczające nowego narzędzia do prac hodowlanych zmierzających do tworzenia odmian mieszańcowych rzepaku.

Zainteresowania habilitantki sięgały jednak jeszcze do dalszych ważnych cech rzepaku. W czwartej z publikacji zajęła się ona analizą markerów dla cechy jakościowej rzepaku jaką jest skład kwasów tłuszczowych. Na szczególną uwagę zasługuje problem obniżenia zawartości wielonienasyconego kwasu linolenowego dla uzyskania większej trwałości oleju. Krajowa hodowla dąży do uzyskania nowych odmian o takich właśnie parametrach jakościowych. Pomocne w tym względzie mogą okazać się wyniki prac habilitantki opisane w piątej szóstej i siódmej publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej. Udowadnia w nich, że nagromadzenie recesywnych alleli w dwóch genach desaturazy FAD3A i FAD3C powoduje znaczące obniżenie zawartości kwasu linolenowego w oleju. Ponadto prace prezentują opracowanie nowych markerów allelo-specyficznych dla selekcji alleli obniżających produkcję kwasu linolenowego oraz udoskonalenie systemu multiplex-PCR dla męskiej sterylności. W efekcie opracowano system równoczesnego genotypowania czterech ważnych dla hodowli rzepaku loci przy użyciu markerów specyficznych znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi i wyróżnianych w drodze elektroforezy kapilarnej. Ta nowoczesna metoda selekcji z użyciem markerów molekularnych opracowana przez habilitantkę umożliwia wdrożenie wysoko-przepustowej (z zastosowaniem robotyki) metody detekcji pożądanych genotypów w obszarze genu mitochondrialnego i trzech genów jądrowych rzepaku. Oznacza to możliwość prowadzenia równoczesnej selekcji komponentów do hodowli mieszańcowej i obniżania zawartości kwasu linolenowego w materiałach hodowlanych.

Podsumowując, można stwierdzić, że przedłożona do recenzji praca habilitacyjna dr Katarzyny Mikołajczyk reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy badań, jest nowatorska a równocześnie ma duże znaczenie aplikacyjne w nowoczesnej hodowli rzepaku, gdyż jej efektem jest nowoczesna, innowacyjna metoda selekcji pożądanych genotypów.

### **Ocena dorobku naukowego poza rozprawą habilitacyjną**

Poza pracą habilitacyjną dorobek naukowy habilitantki składa się z ośmiu oryginalnych prac twórczych, sześciu prac przeglądowych, dwóch rozdziałów w monografiach i 34 doniesień konferencyjnych. Pierwsze dwie publikacje habilitantki dotyczą białek rybosomalnych łubinu i sekwencji oraz ekspresji genów je kodujących. Po obronie pracy doktorskiej i rozpoczęciu pracy w Oddziale IHAR w Poznaniu skupiła się na badaniach zmierzających do opracowania markerów na niską zawartość kwasu linolenowego (publikacje 1.2 i 1.4), otrzymywanie podwójnie ulepszonych linii restorerowych rzepaku (publikacja 1.3) oraz ocenę dystansu genetycznego linii przy użyciu markerów molekularnych (publikacje 1.5 i 1.6). W swoich pracach przeglądowych prezentuje możliwości zastosowań markerów molekularnych w hodowli rzepaku. Jednym z ważniejszych ustaleń w dorobku publikacyjnym habilitantki jest stwierdzenie wysoce istotnej dodatniej korelacji między odległością genetyczną komponentów mieszańców heterozyjnych rzepaku a wartością plonu i elementów plonu. Tego typu zależność jest bardzo ważną przesłanką aby w doborze komponentów do tworzenia odmian mieszańcowych kierować się oceną dystansu genetycznego uzyskiwaną przez analizę

markerów molekularnych. Większość prac habilitantki dotyczy rzepaku i markerów molekularnych dla ważnych cech użytkowych. Wyjątkiem jest tu publikacja dotycząca oceny podobieństwa genetycznego materiałów kolekcyjnych kminku (*Carum carvi* L.) analizowanego przy użyciu markerów molekularnych.

Nowatorskie badania habilitantki w zakresie poszukiwania markerów molekularnych dla ważnych cech w hodowli rzepaku przyniosły efekt w postaci innowacji mogącej usprawnić proces hodowlany. Opisują ją dwa patenty krajowe z których pierwszy dotyczy sekwencji genu FAD3 na bazie której generowany jest marker na obniżenie zawartości kwasu linolenowego, a drugi opisuje polimorficzne sekwencje fragmentu służące do ustalenia sekwencji starterów markera dla genu restorera. W obu patentach pierwszym z listy twórców jest dr Katarzyna Mikołajczyk. Jest to dużej rangi osiągnięcie naukowe, tym bardziej że oparta na tych markerach metoda selekcji została także wdrożona do praktycznej hodowli rzepaku. Podkreślić należy iż było to możliwe dzięki silnej determinacji autorki w doprowadzeniu swoich prac badawczych do etapu zastosowania w praktyce, co jest także wynikiem koncentracji jej dorobku naukowego wokół tematyki markerów molekularnych u rzepaku.

#### Podsumowanie

Dorobek naukowy i rozprawa habilitacyjna dr Katarzyny Mikołajczyk reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy, który wynika ze stosowania nowoczesnych narzędzi badawczych genetyki molekularnej i biotechnologii, a także trafnego wyboru tematyki badawczej, która wychodziła naprzeciw realnym potrzebom hodowli rzepaku. Na podkreślenie zasługuje kompletność tego dorobku, to znaczy doprowadzenie od etapu badań podstawowych do opracowania metody selekcji z użyciem markerów molekularnych i jej wdrożenia do praktyki hodowlanej odmian mieszańcowych rzepaku. Dorobek spełnia w pełni wymogi habilitacji i zasługuje na wyróżnienie ze względu na udane połączenie nauki z praktyką, czyli innowacyjność. Osoba dr Katarzyny Mikołajczyk ma ugruntowaną pozycję w światowych badaniach genetycznych nad rzepakiem oraz prezentuje cechy samodzielnego pracownika nauki pod względem naukowym, organizacyjnym i działalności na rzecz rozwoju kadry.

Wnoszę do Rady Naukowej IHAR-PIB w Radzikowie o dopuszczenie dr Katarzyny Mikołajczyk do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego.

Szczecin 28.05.2013 r.

KIEROWNIK KATEDRY  
*Piotr Masojć*  
Prof. dr hab. Piotr Masojć