

Prof. dr hab Iwona Szarejko
Katedra Genetyki
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Śląski, Katowice

Ocena dorobku naukowego i pracy habilitacyjnej dr Katarzyny Mikołajczyk w związku z toczącym się postępowaniem o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Dane ogólne

Dr Katarzyna Mikołajczyk ukończyła studia wyższe na kierunku biologia, specjalność biologia molekularna, uzyskując w roku 1986 tytuł magistra biologii. Pracę magisterską pt. „Zmiany potencjału błonowego w mitochondriach *Ascaris suum* mierzone sondą fluorymetryczną dis-C3-(5) ”, wykonała pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Michejdy. W latach 1987-96 była zatrudniona w Pracowni Biochemii tRNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. W lutym 1997, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Charakterystyka cDNA kodującego białko rybosomalne P0 łubinu żółtego i jego ekspresja” Rada Naukowa Instytutu Chemii Bioorganicznej nadała Jej stopień doktora nauk chemicznych w zakresie biochemii. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. Jan Barciszewski. Po obronie doktoratu dr K. Mikołajczyk została zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB, Oddział w Poznaniu. W trakcie swej pracy zawodowej odbyła kilka jednomiesięcznych staży naukowych w zagranicznych ośrodkach, w tym trzy przed doktoratem: w Instytucie Biologii Molekularnej Akademii Nauk ZSRR w Moskwie (1987, 1988), Max-Planck-Institute w Berlinie (1988) oraz dwa po doktoracie: w INRA, Le Rheu we Francji (1998) i Justus Liebig Universität, Giesen w Niemczech (2005). W latach 2003-06 była kierownikiem jednego grantu KNB, a w latach 2010-13 wykonawcą zadania w dwóch projektach badawczych MRiRW w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej.

Ocena dorobku naukowego

Dorobek naukowy dr Katarzyny Mikołajczyk, poza publikacjami wyłączonymi jako rozprawa habilitacyjna, jest raczej skromny, gdyż po doktoracie obejmuje zaledwie 11 pozycji, w tym 6 prac oryginalnych, 3 prace przeglądowe i 2 rozdziały w monografiach. Spośród 6 publikacji oryginalnych aż 5 zostało opublikowanych w krajowym czasopiśmie *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops* (w tym 3 w języku polskim), a zaledwie jedna została przyjęta do druku w czasopiśmie z listy JCR *Acta Scientiarum Agronomy* o $\text{IF}=0.43$.

Biorąc pod uwagę fakt, że przed doktoratem Kandydatka opublikowała 4 prace (2 oryginalne i 2 przeglądowe), trudno uznać, że Jej dorobek naukowy został znacząco powiększony w ciągu 12 lat pracy, jakie minęły od doktoratu po odliczeniu urlopów wychowawczych. Odzwierciedla to także parametryczna ocena dorobku naukowego dr K. Mikołajczyk: wg punktacji MNiSW z 2012, przed doktoratem uzyskała Ona 50 pkt, a sumaryczny IF Jej prac wynosił 2,22, natomiast po doktoracie wartości te wynosiły odpowiednio 99 punktów MNiSW i $\text{IF}=2,74$. Liczba cytowań całego dorobku naukowego wg Web of Science wynosi 4, a Indeks Hirsha = 2. Przyczyną tak niskich wskaźników jest niewątpliwie fakt, że większość prac opublikowano w czasopiśmie krajowym. Ponadto, dr K. Mikołajczyk była pierwszym autorem zaledwie dwóch prac oryginalnych opublikowanych po

doktoracie, a w pozostałych czterech publikacjach jej udział wynosił 25%-30%. Dwie ostatnio opublikowane prace oryginalne, poza pracami włączonymi do rozprawy habilitacyjnej, dzieli aż 9 lat (2013 – 2004).

Znacznie lepiej przedstawia się aktywność naukowa dr K. Mikołajczyk mierzona jej udziałem w konferencjach naukowych. W okresie swego zatrudnienia w IHAR, Oddział Poznań wygłosiła 6 referatów na konferencjach krajowych, 3 referaty na konferencjach lub warsztatach międzynarodowych i 5 na seminariach naukowych macierzystego Instytutu. Była także współautorką 20 doniesień konferencyjnych na ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach i zjazdach naukowych.

Tematyka badań prowadzonych przez dr K. Mikołajczyk po doktoracie dotyczyła i dotyczy nadal wykorzystania markerów molekularnych w hodowli rzepaku. Pierwsze prace z tego zakresu (*Rośliny Oleiste* 1999 oraz 2004) związane były z wykorzystaniem markerów RAPD do identyfikacji genotypów rzepaku charakteryzujących się niską zawartością kwasu linolenowego. W roku 1999 opublikowała pracę przedstawiającą wstępne badania różnicowania DNA grzybni i sklerocjów dwóch patotypów *Sclerotinia sclerotiorum* z zastosowaniem markerów RAPD. Następnie, w zespole kierowanym przez prof. Iwonę Bartkowiak-Brodę, Kandydatka prowadziła badania nad zastosowaniem markerów DNA do analiz różnicowania genetycznego form hodowlanych rzepaku, w tym do analiz dystansu genetycznego pomiędzy liniami męsko-sterylnymi oraz liniami restorerów wykorzystywanymi w hodowli heterozyjnej. Prowadziła również badania zależności między różnicowaniem genetycznym linii rodzicielskich a wartością uzyskiwanego plonu, z zastosowaniem markerów RAPD. Ich wynikiem są dwie prace opublikowane w *Roślinach Oleistych* (2003 i 2004) oraz wystąpienia konferencyjne. Dorobek ten uzupełniają prace przeglądowe, poświęcone wykorzystaniu metod molekularnych, przede wszystkim markerów DNA w hodowli jakościowej rzepaku i innych roślin z rodziny *Brassicaceae*.

Ocena pracy habilitacyjnej

Pracę habilitacyjną dr K. Mikołajczyk stanowi cykl siedmiu publikacji z lat 1998-2011, wydany przez IHAR-PIB, Radzików k. Warszawy, jako tom Nr 40/2013 serii Monografie i Rozprawy Naukowe. Zaprezentowana monografia pt. „**Markery genetyczne w programach hodowli rzepaku**” składa się ze wstępu, wykazu i charakterystyki publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, podsumowania wraz z wnioskami, spisu literatury i streszczenia. Drugą część tomu stanowią kopie publikacji stanowiących przedmiot rozprawy habilitacyjnej. We wstępie, Autorka przedstawia przegląd literatury, odnosząc się do celów hodowlanych rzepaku, ze szczególnym uwzględnieniem hodowli jakościowej i heterozyjnej. Autorka bardziej szczegółowo przedstawia szlaki biosyntezy kwasów tłuszczowych i rolę desaturazy FAD3 w tworzeniu kwasu linolenowego (C18:3) oraz wykorzystanie markerów molekularnych w selekcji ważnych użytkowo cech rzepaku. Rozdział ten kończy sformułowaniem celu pracy, którym było: „opracowanie i wdrożenie markerów genetycznych, znajdujących zastosowanie w programach hodowli heterozyjnej i jakościowej rzepaku”. Z tak sformułowanym celem łączy się zapewne wybór z całego dorobku naukowego Kandydatki tych publikacji, które przedstawia Ona jako rozprawę habilitacyjną. Jest to siedem prac: sześć z nich prezentuje oryginalne wyniki badań, a jedna to publikacja przeglądowa. Trzy prace opublikowano w czasopiśmie *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, lecz trzy pochodzą z czasopism indeksownych w JCR – *Plant Breeding* (2 prace) i *Journal of Applied Genetics* (1). Ostatnia z publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej stanowi rozdział w książce *Plant Breeding*, wydanej przez InTech Open Access Publisher. Sumaryczny IF tych prac = 4,419, łączna punktów MNiSW = 90, liczba cytowań = 2, a index Hirsha wynosi 1.

W sześciu publikacjach będących przedmiotem habilitacji dr K. Mikołajczyk jest pierwszym, a w jednej drugim, równorzędnym autorem. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami Współautorów, we wszystkich przedstawionych pracach Kandydatka postawiła problem badawczy, wybrała metody jego rozwiązania, wykonała większość eksperymentów i przygotowała manuskrypty do druku.

Prezentowane jako rozprawa habilitacyjna prace pochodzą z lat 1998-2012, a więc powstały w ciągu 14 lat. To bardzo długi okres, szczególnie w biologii molekularnej. W tym miejscu zastanawia mnie wybór prac, które Autorka wyłączyła z całości swego dorobku jako rozprawę habilitacyjną. Nie wiem, czym się kierowała, wybierając do rozprawy habilitacyjnej pracę przeglądową z 2003 roku *Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I. (2003) Markery DNA w hodowli jakościowej rzepaku ozimego (Brassica napus L.) w aspekcie modyfikacji zawartości kwasów tłuszczowych. Rośliny Oleiste - Oilseed Crops XXIV (1): 33-49.* Praca przeglądowa z sprzed 10 lat jest po prostu nieaktualna. Jednak nawet zamieszczenie w rozprawie habilitacyjnej jednej z późniejszych prac przeglądowych Autorki, np. pracy z 2007 roku: [*Mikołajczyk K. (2007) Development and practical use of DNA markers in oilseed rape quality breeding. W: Advances in Botanical Research, wyd. przez Elsevier (red. J.-C. Kader, M. Delseny), tom 45 Rapeseed Breeding (red. S. K. Gupta), rozdz. 4, str. 99-138*] lub publikacji z 2008 roku: [*Mikołajczyk K. (2008) Zastosowanie genomiki strukturalnej i funkcjonalnej w nowoczesnej hodowli roślin z rodziny Brassicaceae. Structural and functional genomics usage for modern breeding of Brassicaceae. Rośliny Oleiste - Oilseed Crops XXIX (2): 273- 289*], nie spełniłoby warunku aktualności, biorąc pod uwagę rozwój genomiki funkcjonalnej roślin uprawnych i postęp w jej wykorzystaniu w hodowli, jaki nastąpił w ostatnich latach.

Tematyka sześciu prac oryginalnych wybranych do rozprawy habilitacyjnej jest identyczna z pozostałymi pracami z dorobku Autorki – dotyczy wykorzystania markerów DNA w hodowli heterozyjnej i jakościowej rzepaku. W trzech pracach

- *Mikołajczyk K., Matuszczak M., Piętka T., Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. (1998) Zastosowanie markerów DNA do badań składników odmian mieszańcowych rzepaku. Rośliny Oleiste - Oilseed Crops XIX (2): 463-473.*
- *Mikołajczyk K., Dabert M., Nowakowska J., Podkowiński J., Popławska W. and Bartkowiak- Broda I. (2008) Conversion of the RAPD OPC02n₅₀ marker of the Rfo restorer gene into a SCAR marker for rapid selection of oilseed rape. Plant Breeding 127: 647-649.*
- *Mikołajczyk K., Dobrzycka A., Podkowiński J., Popławska W., Spasibionek S., Bartkowiak- Broda I. (2010) A multiplex PCR assay for identification of the ogura male sterile cytoplasm and the Rfo restorer gene among oilseed rape breeding forms. Rośliny Oleiste - Oilseed Crops XXXI (2): 201-210*

dr K. Mikołajczyk przedstawia wyniki badań dotyczące otrzymania markerów genetycznych dla systemu męskiej sterility typu *ogura* i wdrożenia tych markerów do selekcji form męsko-sterylnych i restorerów. Pierwsza z tych prac pochodzi z 1998 roku i przedstawia zaadaptowanie dwóch markerów DNA opisanych w literaturze: SCAR-CMS i RAPD OPC02₁₁₅₀ do wdrożenia i zastosowania w hodowli mieszańcowej rzepaku prowadzonej w IHAR, Oddział Poznań. Za istotne osiągnięcie tej pracy Autorka uważa także zaadaptowanie metody izolacji DNA z młodych liści rzepaku. Biorąc pod uwagę fakt, że praca pochodzi sprzed 15 lat i nie przedstawia oryginalnych wyników badań, lecz jedynie adaptację już istniejących metod, uważam, że Autorka niepotrzebnie włączyła ją do cyklu prac stanowiących rozprawę habilitacyjną.

Dwie kolejne prace dotyczące zagadnienia markerów dla cytoplazmatycznej męskiej sterility u rzepaku spełniają już warunek wniesienia istotnego wkładu do rozwoju

uprawianej przez Autorkę dyscypliny naukowej. Do najważniejszych wyników tych prac należy zaliczyć:

1. Przekształcenie markera RAPD w marker typu SCAR dla genu restorera *Rfo*, w wyniku sklonowania i zsekwencjonowania fragmentu genomowego DNA rzepaku obejmującego marker RAPD-OPC02₁₁₅₀
2. Wykazanie, że uzyskany marker SCAR-C02, sprzężony z genem restorerem *Rfo*, nie zawiera sekwencji kodującej białko funkcjonalne
3. Opracowanie, w oparciu o metodę wielokrotnego PCR (multipleks PCR), testu genetycznego, obejmującego w jednej reakcji PCR amplifikację markera SCAR-CMS dla cytoplazmatycznej męskiej sterility typu *ogura*, markera SCAR-C02 dla genu restorerowego *Rfo* oraz markera stanowiącego kontrolę wewnętrzną.
4. Wykazanie przydatności opracowanego testu w identyfikacji genotypów (mieszkańców F₁, linii restorerów, rekombinantów etc.) oraz w selekcji form rodzicielskich do tworzenia mieszkańców.

Dwie następne prace włączone do cyklu publikacji habilitacyjnych dotyczą wykorzystania markerów allelo-specyficznych do selekcji form rzepaku o pożądanym składzie kwasów tłuszczowych. Są to prace:

- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W. M., Spasibionek S., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. (2010) *Allele-specific SNP markers for the new low linolenic mutant of winter oilseed rape. Plant Breeding 129: 502-507*
- Bocianowski J., Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I. (2012) *Determination of fatty acid composition in seed oil of rapeseed (Brassica napus L.) by mutated alleles of the FAD3 desaturase genes. J Appl Genetics 53: 27-30.*

Dr K. Mikołajczyk, we współpracy z zespołem prof. dr hab. Jana Krzymańskiego prowadziła badania nad otrzymanie form rzepaku o obniżonej, w stosunku do odmian podwójnie ulepszonych, zawartości kwasu linolenowego i podwyższonej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion. Odmiany o takim składzie chemicznym są pożądane jako surowiec stosowany w przemyśle spożywczym, do głębokiego smażenia, a także w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym oraz do produkcji komponentów biopaliw. Zadaniem dr K. Mikołajczyk było znalezienie markerów genetycznych, pozwalających na selekcję form o genotypach kontrolujących pożądaną zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju. Badania, prowadzone w oparciu o otrzymane w IHAR mutanty rzepaku o obniżonej, z ok. 10% do ok. 3% i mniej, zawartości kwasu linolenowego (C18:3), i o podwyższonej, z ok. 65% do ok. 75% i więcej, zawartości kwasu oleinowego (C18:2), pozwoliły Kandydatce zrealizować ten cel. Przedmiotem Jej badań był gen desaturazy FAD3, enzymu regulującego powstanie kwasu linolenowego w dojrzewających nasionach rzepaku. Po sklonowaniu alleli tego genu w genomach A i C rzepaku u form dzikich i mutanta niskolinolenowego, zidentyfikowała mutacje typu SNP, potencjalnie wpływające na zmiany aktywności desaturazy FAD3 w kopiach genu pochodzących z genomu A i C. Po potwierdzeniu istotnej zależności pomiędzy zawartością kwasu linolenowego, oznaczonej metodą biochemiczną, a występowaniem zmutowanych alleli *fad3* w genomach A i C w obrębie kilkuset linii rzepaku z segregujących populacji, Autorka zaproponowała wykorzystanie metody SNaPshot do identyfikacji niezmutowanych i zmutowanych alleli genów FAD3. Metoda ta obejmuje niezależną amplifikację fragmentów o długości około 200 pz z genomów A i C, zawierających miejsca mutacji, mikrosekwencjonowanie z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów, oraz półautomatyczną analizę produktów metodą elektroforezy kapilarnej. Najważniejsze naukowe osiągnięcia tych badań to;

1. Zidentyfikowanie mutacji w genie dla FAD3 genomu A, stanowiącą tranzycję C do T, prowadzącą do substytucji argininy na cysteinę oraz mutacji w genie FAD3 genomu

C, obejmującą tranzycję G do A w miejscu donorowym 5' splicingu w intronie szóstym.

2. Potwierdzenie, że zidentyfikowane w genie *FAD3* mutacje prowadzą do obniżonej zawartości kwasu linolenowego u rzepaku
3. Opracowanie allelo-specyficznych funkcjonalnych markerów dla niezmutowanych i zmutowanych alleli genu desaturazy *FAD3*

Ostatnia praca, którą Kandydatka włączyła do rozprawy habilitacyjnej stanowi podsumowanie jej wcześniejszych osiągnięć w zakresie opracowania markerów dla hodowli heterozyznej i jakościowej rzepaku. W pracy tej (Mikołajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Popławska W., Spasibionek S., Dobrzycka A., Dabert M. (2011) *A multiplex fluorescent assay in molecular breeding of oilseed rape. W: Plant Breeding, wyd. przez InTech Open Access Publisher, red. I. Y. Abdurakhmonov, Część 3: Molecular Markers and Breeding, rozdz. 8, str. 185-200*), Autorka przedstawiła badania, których efektem było połączenie w jeden zestaw testowy markerów SCAR-CMS i SCAR-C02, służących do identyfikacji form męskosterylnych i linii restorerów, oraz allospecyficznych, funkcjonalnych markerów dla genów *FAD3*. Test ten, oparty o wielokrotny PCR ze znakowanymi fluorescencyjnie starterami, służy do precyzyjnej identyfikacji linii męsko-sterylnych z CMS *ogura*, linii restorerów, ich rekombinantów oraz mieszańców zrestorowanych F_1 , z jednoczesnym określeniem wszystkich możliwych kombinacji allelicznych genów *FAD3* w tych liniach. Opracowany test stanowi nowoczesne narzędzie wspomagające selekcję w programach hodowli twórczej rzepaku ozimego, a także jest praktyczną alternatywą dla klasycznych metod fenotypowania.

Ocena praktycznych efektów uzyskanych wyników badań

Bardzo mocną stroną zaprezentowanych przez Kandydatkę badań, jest aplikacyjność uzyskanych przez Nią wyników. Wszystkie opracowane przez dr K. Mikołajczyk markery były od razu testowane na tysiącach linii rzepaku wykorzystywanych bądź otrzymywanych w praktycznych programach hodowlanych tego gatunku. Zarówno markery dla hodowli heterozyznej, jak i dla hodowli jakościowej posłużyły do selekcji rekombinantów o pożądanych cechach, zwiększając w istotny sposób efektywność selekcji. Opracowany ostatecznie zestaw testowy markerów DNA umożliwił identyfikację unikalnych genotypów, w tym mieszańców zrestorowanych F_1 o wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskiej zawartości kwasu linolenowego w oleju nasion, wykazujących obecność markerów dla CMS typu *ogura*, genu restorera *Rfo* i zmutowanych alleli w genach *FAD3* w obu genomach w stanie homozygotycznym. Nowe formy zidentyfikowane przy pomocy opracowanych markerów stanowią bardzo cenny materiał wyjściowy dla twórczej hodowli rzepaku. Opracowane przez dr K. Mikołajczyk testy genetyczne znacznie upraszczają i skracają proces selekcyjny, powodując obniżenie nakładu pracy oraz kosztów, co jest szczególnie istotne w przypadku hodowli roślin o złożonych genomach, do jakich należy rzepak.

Do najważniejszych osiągnięć naukowych dr K. Mikołajczyk, świadczących o praktycznym znaczeniu prowadzonych przez Nią badań, należy zaliczyć uzyskanie przez Nią dwóch patentów na opracowane markery. Są to:

1. **Patent nr PAT.211126, dnia 11.05.2012** udzielony Instytutowi Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Polska przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej na wynalazek „Sekuencje nukleotydowe fragmentów niezmutowanych i zmutowanych alleli loci A i C genu desaturazy *fad 3* form - podwójnie ulepszonej (00) oraz niskolinolenowego mutantu (LLMut) roślin rzepaku ozimego, sekwencje nukleotydowe par starterów do amplifikacji loci A i C genu desaturazy *fad3* (...)”.
2. - **Patent nr PAT.212433, dnia 02.11.2012** udzielony Instytutowi Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Polska przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej „Sekuencje

nukleotydowe starterów specyficznych dla krańcowych rejonów badanego fragmentu DNA sprzężonego z genem restorerem Rfo dla CMS ogum u rzepaku, sposób amplifikacji DNA w łańcuchowej reakcji polimerazy za pomocą starterów specyficznych dla fragmentu genomowego DNA sprzężonego z genem Rfo dla CMS ogum u rzepaku (...)”.

W obu przypadkach dr K. Mikołajczyk była głównym twórcą wynalazków, stanowiących przedmiot patentu.

Za swe osiągnięcia dr K. Mikołajczyk została odznaczona między innymi odznaką honorową „Zasłużony dla rolnictwa”, nadaną 16 marca 2010 roku przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi oraz Nagrodą Zespołową przyznaną dnia 9 listopada 2012 roku przez Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w temacie badawczo- wdrożeniowym „Opracowanie metody hodowli odmian mieszańcowych restorowanych rzepaku ozimego wspomaganą markerami molekularnymi i wdrożenie do praktyki hodowlanej”; zespół autorski: prof. dr hab. Iwona Bartkowiak-Broda, dr Alina Liersch, dr Katarzyna Mikołajczyk., dr Wiesława Popławska, mgr inż. Janina Woś, dr inż. Henryk Woś.

Wniosek końcowy

Reasumując, pragnę stwierdzić, że dr Katarzyna Mikołajczyk uzyskała nowe dla nauki wyniki, o dużym znaczeniu praktycznym, potwierdzonym opatentowaniem najważniejszymi rezultatami swojej pracy. W mojej opinii, choć Kandydatka niepotrzebnie włączyła do rozprawy habilitacyjnej pracę sprzed 15 lat i niezbyt aktualną publikację przeglądową, pięć pozostałych prac przedstawionych w monografii habilitacyjnej, stanowi cykl spełniający wymogi stawiane rozprawom habilitacyjnym w Ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003. Choć pozostały dorobek naukowy Kandydatki jest skromny, znaczenie, jakie mają dla nowoczesnej hodowli rzepaku otrzymane przez nią wyniki, upoważnia mnie do wystąpienia do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB z wnioskiem o dopuszczenie dr Katarzyny Mikołajczyk do dalszych etapów przewodu habilitacyjnego,

Katowice 10 września 2012


Iwona Szarejko