

Gdańsk, dnia 9 września 2024 r.

Prof. dr hab. Ewa Łojkowska
Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku
Abrahama 58 80-307 Gdańsk

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister Katarzyny Gajek
z tytułowanej „Analiza funkcjonalna genów potencjalnie związanych z rozwojem
włosników u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani magister Katarzyny Gajek, wykonana pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Iwony Szarejko w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, jest opracowaniem zawartym na 169 stronach maszynopisu i zawiera 17 tabel (plus 11 w Aneksie) i 29 rycin (plus 4 w Aneksie). Tekst recenzowanej pracy doktorskiej obejmuje istotne i wymagane części tj. wykaz skrótów, cele pracy, przegląd literatury, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis literatury oraz streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis literatury.

Recenzowana rozprawa napisana jest dobrym i klarownym językiem, wykorzystane w pracy metody oraz uzyskane wyniki badań są bardzo dobrze opisane i udokumentowane. Praca reprezentuje nowoczesny kierunek badawczy polegający na wykorzystaniu, tak strategii klasycznej analizy genetycznej (ang. forward genetics) jak i strategii odwrotnej genetyki (ang. reverse genetics) do identyfikacji genów warunkujących tworzenie i wydłużanie się włosników, organów istotnych dla procesów rozwojowych i odporności na

niekorzystne warunki środowiskowe ważnej gospodarczo roślinie uprawnej jaką jest jęczmień.

W rozdziale **Wstęp i cele badań** Pani Katarzyna Gajek dobrze uzasadniła wybór tematyki badawczej i sprecyzowała cel pracy, którym było zidentyfikowanie nowych genów kodujących białka wpływające na wzrost i rozwój włośników i określenie funkcji kodowanych przez nie białek w kształtowaniu się systemu korzeniowego jęczmienia. Cel pracy badawczej realizowanej w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam za wysoce uzasadniony. Roślina będąca przedmiotem badań - jęczmień (*Hordeum vulgare* L.), zajmuje, wśród zbóż, czwarte miejsce na świecie pod względem areału upraw (po pszenicy, kukurydzy i ryżu) i stanowi ważny surowiec w produkcji żywności i pasz. Jest zatem jedną z najważniejszych roślin uprawnych, a badania nad czynnikami genetycznymi warunkującymi jej prawidłowy wzrost i rozwój, także w warunkach stresu abiotycznego czyli przede wszystkim niekorzystnych warunków klimatycznych są bardzo istotne. Badania nad czynnikami genetycznymi determinującymi rozwój włośników są ważne gdyż efektywnie funkcjonujący system korzeniowy z dobrze wykształconymi włośnikami determinuje rozwój roślin i ich plonowanie. Podjęte przez doktorantkę badania nad identyfikacją genów warunkujących powstawanie i rozwój włośników korzeniowych są szczególnie ważne, gdyż włośniki pełnią istotną rolę w rozwoju roślin poprzez udział w pobieraniu wody i soli mineralnych, interakcję z mikroorganizmami glebowymi oraz kontakt rośliny z wszystkimi elementami podłoża. Istotne jest także, iż mechanizmy molekularne determinujące wzrost i rozwój włośników korzeni roślin jednoliściennych są ciągle słabo poznane. Przeprowadzone badania są szczególnie istotne w obliczu zmian klimatycznych, objawiających dłuższymi okresami suszy i niedoboru wody. Obecność włośników, ich długość i liczba, może być istotną cechą w hodowli nowych odmian jęczmienia wykazujących większą odporność na niedobór wody.

W ostatnich latach coraz więcej procesów fizjologicznych, szczególnie tych, które mają istotne znaczenia dla uzyskania wysokiej jakości i ilości plonu, jest wyjaśniana na poziomie molekularnym. Założeniem doktorantki było, iż dostępne w jednostce naukowej, w której wykonywała badania mające być podstawą jej rozprawy doktorskiej, mutanty roślin jęczmienia a w efekcie możliwość ich analizy molekularnej pozwolą nie tylko na identyfikację genów determinujących rozwój włósników.

Ocena części teoretycznej (przeglądu literatury) rozprawy doktorskiej

Przygotowany przez doktorantkę przegląd literatury przedmiotu jest interesująco i przejrzysto napisany. Opisano w nim bardzo kompetentnie, w oparciu o najnowszą literaturę, szereg różnych zagadnień:

- znaczenie włósników w rozwoju roślin oraz mechanizm rozwoju tych organów u roślin jednoliściennych, szczególną uwagę doktorantka zwróciła na opisanie trzech różnych wzorów ryzosfery i występujących w jej obrębie komórek trichoblastów i atrichoblastów;
- proces formowania się zawiązków włósników i ich wzrost wydłużeniowy;
- metody identyfikacji i analizy funkcjonalnej genów u roślin o dużych, także poliploidalnych genomach;
- metody uzyskiwania mutantów i możliwości ich wykorzystanie w analizie funkcjonalnej genów;
- klonowanie pozycyjne, TILLING oraz przewidywanie funkcji genów na podstawie homologii ich sekwencji;
- metody identyfikacji funkcji genów w oparciu o wykorzystanie nowoczesnych technologii sekwencjonowania (NGS);
- analizy badania ekspresji genów i funkcji kodowanych przez białek.

Warto podkreślić, iż wszystkie omówione zagadnienia są opisane bardzo jasno i pozwalają na dobre zrozumienia podjętych przez doktorantkę zadań i etapów pracy badawczej.

Oceniając część rozprawy zatytułowaną **Materiały i Metody** muszę podkreślić, iż jest ona bardzo obszerna i w sposób niezwykle szczegółowy opisano w niej wszystkie wykorzystane w recenzowanej rozprawie metody badawcze: przeprowadzony na podstawie danych literaturowych i *in silico* wybór genów do analizy funkcjonalnej, identyfikację mutacji w wybranych genach z wykorzystaniem strategii TILLING, identyfikację osobnika M₂ z mutacją oraz określenie na podstawie analizy *in silico* wpływu mutacji na strukturę i funkcjonalność kodowanego przez zmutowany gen białka a także metody analizy obrazowej strefy włósnikowej korzeni mutantów. Bardzo dokładnie opisano także metody analizy genetycznej: analizę ko-segregacji zidentyfikowanych mutacji z fenotypem, test komplementacji oraz analizy fenotypu systemu korzeniowego. Opisano także metody zastosowane do sekwencjonowania egzomu, identyfikacji genu kandydackiego, konstrukcji drzewa filogenetycznego zidentyfikowanego genu oraz analizę ekspresji genu przy pomocy techniki RT-qPCR. Nie mam uwag krytycznych do tej części rozprawy doktorskiej Katarzyny Gajek, wszystkie metody opisano bardzo wyczerpująco.

Rozdział **Wyniki** składa się z 3 podrozdziałów, w których w sposób wyczerpujący opisano: wybór genów potencjalnie zaangażowanych w morfogenezę włósników jęczmienia do analizy funkcjonalnej przeprowadzonej z zastosowaniem strategii TILLING. Wytypowano 3 geny: *HvRIC10*, *HvOPR1* i *HvEXPB5*, scharakteryzowano ich strukturę i zidentyfikowano w ich obrębie mutacje. Ostatnim etapem badań była analiza fenotypu strefy włósnikowej mutantów w wybranych genach. Analiza 39 mutacji zidentyfikowanych w badanych genach i obserwacje fenotypowe strefy włósnikowej wykazały, iż tylko w przypadku mutantu *hvexpb5.i* zaobserwowano znaczne zaburzenia w

rozwoju włośników względem formy rodzicielskiej; obserwowano znaczące skrócenie długości włośników. Dalsze badania polegające na skrzyżowaniu mutantu niosącego allel *hvexpb5.i* z odmianą wyjściową *Sebastian*, wykazały jednak, iż zidentyfikowana w genie *HvEXPB5* mutacja nie ko-segreduje z fenotypem skróconych włośników.

W tym kontekście chciałabym zadać doktorantce pytanie o to jak ocenia przydatność strategii TILLING do identyfikacji genów warunkujących ważne funkcje w procesach wzrostu i rozwoju roślin. Jakie podejście uważa Pani za najskuteczniejsze w wyborze genów do analizy TILLING?

Dalsze badania pozwoliły na stwierdzenie, iż mutant *hvexpb5.i* niesie cechę skrócenia włośników alleliczną do zidentyfikowanych wcześniej mutantów w genie *Rhp1*. W efekcie dalszej analizy poddano o pełnej nazwie *hvexpb5.i/ rhp1.e*, a dla uproszczenia nazwano go *rhp1.e*. Dalsze badania podjęte metodą sekwencjonowania egzomu mutantu *rhp1.e* doprowadziły do identyfikacji genu *HORVUIHr1G077230*, kodującego syntazę celulozy C1 (HvCSLC1), która może być zaangażowana w syntezę ksyloglukanu. W kolejnym etapie badań stwierdzono ko-segregację fenotypu mutantu *rhp1.e* z mutacją w genie *HORVUIHr1G07723* i w efekcie stwierdzono, iż gen *HORVUIHr1G077230* jest najlepszym, wśród zidentyfikowanych, kandydatem kodującym białko mające istotne znaczenie w procesie wzrostu szczytowego włośników. Ostatnim etapem badań była analiza ekspresji genów potencjalnie związanych z syntezą ksyloglukanów we włośnikach jęczmienia. W efekcie doktorantka wykazała, iż mutacja w genie *HORVUIHr1G077230* i brak aktywności syntazy celulozy C1 (HvCSLC1) powoduje obniżenie syntezy ksyloglukanu, podczas wzrostu szczytowego włośników jęczmienia.

Przeprowadzone przez Panią Katarzynek Gajek kompleksowe badania pozwoliły w efekcie na zidentyfikowanie genu *HORVUIHr1G077230* jako istotnego dla wzrostu

szczytowego włóśników oraz na zaproponowanie modelu szkieletu ksyloglukanu występującego we włóśnikach jęczmienia.

Uważam, iż także **Dyskusja** uzyskanych w ramach badań wyników jest bardzo dobrze i klarownie napisana. Doktorantka przedyskutowała w niej, w oparciu o wyniki własne oraz dane literaturowe liczne informacje dotyczące mechanizmów molekularnych związanych z tworzeniem i wydłużaniem się włóśników u *Hordeum vulgare* i innych roślin z rodziny *Poaceae*. Omówiła także, w świetle dostępnej literatury procesy metaboliczne prowadzące do syntezy złożonych strukturalnie cząsteczek ksyloglukanu. Podsumowując uzyskane wyniki dotyczące identyfikacji genu *HORVUIHr1G077230* zaangażowanego w biosyntezę ksyloglukanu doktorantka przedstawiła jasny, czytelny i dobrze udokumentowany schemat syntezy tego związku.

Niewątpliwie największymi osiągnięciami doktorantki było stwierdzenie po raz pierwszy, iż cecha silnie skróconych włóśników mutantu *hvexpb5.i/rhpl.e* jęczmienia (*Hordeum vulgare*) jest kontrolowana przez mutację w locus *Rhp1*. Potwierdzeniem tezy doktorantki było wykazanie, iż w korzeniach mutantów allelicznych z mutacjami w genie *HvCSLC1* następuje spadek poziomu ekspresji genu *HvCSLC1*, a w efekcie obserwujemy niższy poziom białka – syntazy celulozy, w porównaniu do odmian wyjściowych. Bardzo istotne było także wykazanie, iż mutant *rhpl.e* nie wykazuje zmian w budowie systemu korzeniowego w stosunku do odmiany wyjściowej, a zatem gen *HvCSLC1* nie ma wpływu na rozwój korzeni jęczmienia, a istotny jest tylko dla wzrostu szczytowego włóśnika. W podsumowaniu recenzji chciałabym stwierdzić, iż cała rozprawa magister Katarzyny Gajek jest napisana jasnym, zrozumiałym i starannym językiem. Nie znalazłam w pracy „slangu laboratoryjnego”. Na pochwałę zasługuje bardzo staranne przygotowanie edytorskie pracy. Uważam, że przedstawiona rozprawa zawiera bardzo ciekawe wyniki, wnoszące nowe i cenne informacje na temat mechanizmu regulacji procesu wzrostu włóśników w korzeniach roślin jednoliściennych. Uzyskane w wyniku

trudnych i pracochłonnych badań dane zostały już częściowo opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences (Int J Mol Sci, 2021, 22, 13411)*, a kolejna część będzie zapewne opublikowana w postaci kolejnego artykułu czasopiśmie(o zasięgu międzynarodowym).

Wyrażam uznanie doktorantce i Pani Prof. dr hab. Iwonie Szarejko, promotorce rozprawy doktorskiej. Oceniana rozprawa znakomicie dokumentuje opanowany przez Panią Katarzynę Gajek warsztat naukowy, który umożliwia jej prowadzenie w przyszłości ważnych naukowo i aplikacyjnie badań związanych z uzyskiwaniem roślin użytkowych o podwyższonej odporności na stresy abiotyczne i biotyczne.

Wnioski końcowe

W świetle przedstawionej powyżej, bardzo pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej magister Katarzyny Gajek wnoszę do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzowana praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13.ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tj. Dz. U. z 2017 poz.1789) w związku z art. 179 ust. 1, z dnia 3 lipca 2018 r. Ustawy Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1669), który stanowi, że „przewody doktorskie(...) wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy (...) są przeprowadzane na zasadach dotychczasowych, z tym, że jeżeli nadanie stopnia doktora następuje po 30.04.2019 r. stopień nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art.5 ust.3 tej ustawy”.

Wobec powyższego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Gajek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie z pełnym przekonaniem stawiam wniosek o wyróżnienie bardzo wartościowej rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Gajek.



Ewa Łojkowska