

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 10 stycznia 2022r.

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia 13. 01. 2022r
WBO-D 520-1.2 | 2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Tomasza Oleszkiewicza pt.
„Tkanka kalusowa jako układ modelowy do badania biosyntezy i akumulacji
karotenoidów u marchwi uprawnej (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*)”**

Wprowadzenie

Metabolizm karotenoidów od dawna budzi duże zainteresowanie biologów roślin. Karotenoidy roślinne są bowiem nie tylko ważnym źródłem prowitaminy A w diecie człowieka, ale wpływają na szereg cech użytkowych roślin uprawnych. W przypadku marchwi wyselekcjonowanie roślin o pomarańczowych korzeniach sprawiło, że gatunek ten stał się jednym z najważniejszych gatunków warzyw. Należy jednak zauważyć, że metabolizm karotenoidów u marchwi ciągle nie jest do końca dobrze poznany. Wobec ograniczeń technicznych związanych z badaniem biosyntezy i akumulacji karotenoidów w korzeniach szuka się nowych układów modelowych pozwalających na efektywne poznawanie tych procesów. Udaną próbę opracowania takiego układu podjął Autor przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej, Pan mgr inż. Tomasz Oleszkiewicz. Opracowany przez Autora układ badawczy jest oparty o tkanki kalusowe wyprowadzone z korzeni marchwi, różniące się zdolnością do akumulacji karotenoidów. Ten oparty o kultury *in vitro* układ znakomicie się sprawdził, co pozwoliło Autorowi na wykonanie serii doświadczeń, które dostarczają nowej wiedzy na temat biosyntezy i akumulacji karotenoidów u marchwi. Recenzowana praca została wykonana pod kierunkiem Pana profesora dr. hab. inż. Rafała Barańskiego w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Dane formalne o rozprawie

Zasadniczą część rozprawy stanowią trzy oryginalne i spójne tematycznie publikacje oraz poprzedzające je opracowanie. Publikacje te ukazały się w pismach naukowych o znaczących współczynnikach oddziaływania (IF). Pierwsza praca ukazała się w 2018 roku w piśmie *Planta* (IF=3.06), druga w 2021 roku w *Plants* (IF=3.935), zaś trzecia także w 2021 roku w *International Journal of Molecular Sciences* (IF=5.923). Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których opublikowano te prace jest wysoki i wynosi 12.918. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, a jego wkład w powstanie tych prac był merytorycznie istotny i dominujący. Doktorant uczestniczył w opracowywaniu koncepcji badań, realizując część doświadczeń i wyprowadzał materiał badawczy i zakładał

doświadczenia, wykonywał obserwacje *in vitro*, analizy ekspresji genów, oznaczał zawartość karotenoidów, wykonywał edycję genów, przeprowadzał analizy wyników, a także przygotowywał pierwsze wersje manuskryptów i brał udział w tworzeniu ostatecznych wersji publikacji. Ponadto Doktorant pozyskał finansowanie na badania, których wyniki zostały opublikowane w drugiej pracy, jest także autorem korespondencyjnym tej publikacji. Załączone oświadczenia współautorów o ich wkładzie w powstanie tych prac są w pełni zgodne z oświadczeniami Doktoranta.

Opracowanie poprzedzające cykl publikacji stanowi podsumowanie treści zawartych w tych publikacjach. Opracowanie obejmuje następujące rozdziały: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wykaz skrótów, streszczenia, wstęp, cel, hipotezy i zadania badawcze, materiały i metody, omówienie wyników przeprowadzonych badań, podsumowanie i wnioski oraz uzupełnienie i spis literatury.

W rozprawie została zamieszczona informacja, że praca została wykonana w ramach dwóch projektów Narodowego Centrum Nauki - projektu OPUS 5 kierowanego przez promotora pracy i projektu PRELUDIUM 16, którego kierownikiem był Doktorant. Ponadto w trakcie realizacji pracy doktorskiej Doktorant otrzymał stypendium naukowe w konkursie ETIUDA 7. Ponadto, w uzupełnieniu Doktorant przedstawił informacje o innych pracach badawczych, w których wykorzystane zostały linie kalusowe wyprowadzone przez Doktoranta.

Ocena rozprawy

We wstępie Autor przedstawił aktualną wiedzę związaną z problematyką badawczą pracy. Omówił biologię i znaczenie gospodarcze marchwi uprawnej, przedstawiając aktualne informacje o światowej i krajowej produkcji marchwi. Następnie w przejrzysty sposób przedstawił szlak biosyntezy karotenoidów i wskazał czynniki wpływające na akumulację tych związków ze szczególnym uwzględnieniem specyfiki badanego gatunku. W ostatniej części wstępu Doktorant krótko omówił wykorzystanie kultur kalusowych i technik edycji genomów w pracach badawczych nad marchwią. Uważam, że rozdział ten jest bardzo dobrze napisany i stanowi dobre wprowadzenie do tematyki pracy. W następnym rozdziale Doktorant przedstawił cel pracy, cztery hipotezy badawcze i zdefiniował pięć zadań badawczych. Realizacja tych zadań pozwoliła na osiągnięcie celu pracy i zweryfikowanie postawionych hipotez. Doktorant dobrze uzasadnił cel pracy, a hipotezy badawcze są właściwie sformułowane. W rozdziale zatytułowanym „Materiały i metody” Doktorant przedstawił materiał badawczy i jego pochodzenie, podstawowe pożywki stosowane *in vitro* i wymienił metody badawcze wykorzystywane w pracy wskazując jednocześnie publikacje, w których zostały szczegółowo opisane. Ponadto Doktorant przedstawił informacje o współpracy z innymi ośrodkami badawczymi. Zaawansowane analizy karotenoidów wykonano we współpracy z zespołem z Uniwersytetu Wrocławskiego zaś mikroskopię elektronową we współpracy z zespołami z Uniwersytetu Śląskiego. Kolejna część rozprawy poświęcona jest omówieniu najważniejszych wyników oraz ich dyskusji. Wyniki z realizacji poszczególnych zadań badawczych zostały opublikowane w postaci trzech prac.

W pierwszym etapie realizacji pracy Doktorant opracował i scharakteryzował autorski układ badawczy oparty o wyprowadzone w kulturach *in vitro* linie kalusa różniące się istotnie zawartością karotenoidów (publikacja 1). Do zainicjowania kalusa wykorzystana została wysoce homozygotyczna linia marchwi DH1 o pomarańczowych korzeniach, której genom jest obecnie genomem referencyjnym tego gatunku. Ten wybór był bardzo dobry i ułatwił dalsze prace, przede wszystkim związane z analizą ekspresji genów szlaku biosyntezy karotenoidów. By zainicjować kalus, Doktorant zastosował klasyczne podejście polegające na wykładaniu krążków korzeni na pożywkę z dodatkiem syntetycznej auksyny 2,4-D, co pozwoliło na uzyskanie jasno żółtego kalusa. W trakcie namnażania kalusa Doktorant zaobserwował powstawanie komórek o intensywnej pomarańczowej barwie i w wyniku selekcji uzyskał kalus o barwie pomarańczowej. Linie kalusa różniące się barwą zostały szczegółowo zbadane i stwierdzono znaczne różnice w zawartości i składzie karotenoidów oraz ich pochodnych – kalus jasno żółty zawierał minimalne ilości karotenoidów, zaś pomarańczowy charakteryzował się zawartością karotenoidów zbliżoną do korzeni linii wyjściowej marchwi. Wyprowadzenie tych linii kalusowych było kluczowe i umożliwiło Doktorantowi ustalenie modelowego układu badawczego, w którym wyniki analiz odnoszono do korzenia marchwi. Do najciekawszych wyników tego etapu badań należy ujawnienie zróżnicowania strukturalnego chromoplastów w tkance akumulującej karotenoidy, w tym opisanie po raz pierwszy u marchwi chromoplastów błoniastych. Ważnym osiągnięciem jest także wykonanie kompleksowej analizy porównawczej transkrypcji genów szlaku biosyntezy karotenoidów. Wyniki te są szczególnie ważne z punktu widzenia inżynierii metabolicznej, ponieważ dostarczają nowej wiedzy umożliwiającej modelowanie szlaku biosyntezy karotenoidów metodami biotechnologicznymi.

Kolejny etap pracy jest następstwem zaobserwowania przez Doktoranta, że skład pożywki wpływa na intensywność barwy pomarańczowego kalusa (publikacja 2). Doktorant zdecydował się na przeprowadzenie doświadczeń, których celem było wyjaśnienie, który ze składników pożywki na kluczowy wpływ na metabolizm karotenoidów. Doświadczenia te zostały bardzo dobrze zaplanowane, a systematyczne testowanie pożywek pozwoliło na stwierdzenie, że przede wszystkim forma amonowa azotu wpływa na akumulację karotenoidów. Doktorant wykazał, że zwiększenie zawartości formy amonowej azotu w stosunku formy azotowej prowadzi do zmniejszonej akumulacji karotenoidów. Wyniki te sugerują dalsze kierunki badawcze. Ciekawe byłoby poznanie mechanizmu regulacji akumulacji karotenoidów w zależności od dostępnej formy azotu, a także sprawdzenie wpływu różnych schematów nawożenia azotowego na zawartość karotenoidów w korzeniach marchwi w uprawie polowej.

W ostatnim etapie prac Doktorant wykorzystał technologię CRISPR/Cas9 by uzyskać mutacje w genach *PSY1* i *PSY2*, kodujących izoformy syntazy fitotenu, kluczowego enzymu szlaku biosyntezy karotenoidów (publikacja 3). Doktorant wykonał udaną edycję tych genów wykorzystując metodykę opracowaną w zespole i autorskie konstrukcje, które przygotował tak, aby nukleaza Cas9 rozpoznawała nie jedno, ale dwa miejsca w danym genie. Konstrukcje te były wykonane we współpracy z profesorem Yipingiem Qi z University of Maryland w Stanach Zjednoczonych, który jest jednym z czołowych badaczy zajmujących się edycją

genów roślinnych. W doświadczeniach uzyskano łącznie 11 linii kalusowych, w tym po pięć linii z mutacjami w genach *PSY1* i *PSY2* oraz 1 linię zawierającą zmianę w pobliżu genu *PSY2*. Co ciekawe, na poziomie sekwencji poszczególne mutacje różniły się znacząco od siebie (substytucje i insercje pojedynczych nukleotydów, delecje różnej długości), jednak niezależnie od charakteru zmian wszystkie linie z mutacjami w genie *PSY2* nie akumulowały karotenoidów podczas gdy linie z mutacjami w genie *PSY1* i linia ze zmianą w rejonie otaczającym gen *PSY2* akumulowały karotenoidy na niezmiennym poziomie. Doktorant stwierdził, że w liniach z mutacjami w genie *PSY2*, dominującymi plastydami były amyloplasty całkowicie wypełnione skrobią, nie zawierające kryształów karotenoidowych, zaś ściana komórkowa miała zmieniony skład chemiczny. Doktorant pokazał, że biosynteza karotenoidów w kalusie marchwi jest zależna od obecności funkcjonalnego genu *PSY2*, zaś rola *PSY1* jest raczej marginalna. Stwierdził też, że zmutowanie genu *PSY2* skutkuje obniżeniem poziomu ekspresji *PSY1*, co ujawnia skoordynowaną regulację ekspresji tych genów. Innym ważnym wynikiem, jest powiązanie metabolizmu karotenoidów z procesami remodelowania ściany komórkowej. Wymiernym efektem tej części badań jest uzyskanie oryginalnych linii kalusa z mutacjami w genach *PSY*, które stanowią unikalny materiał badawczy przydatny w pracach nad biogenezą plastydów i wpływem metabolizmu karotenoidów na inne procesy komórkowe.

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski”, Doktorant podsumował najważniejsze wyniki badań oraz przedstawił w punktach dziesięć wniosków. Wnioski te w wynikają z przeprowadzonych badań, których wyniki opublikowano, są dobrze sformułowane i jednoznacznie potwierdzają, że cel pracy został osiągnięty, a postawione hipotezy badawcze zweryfikowane.

Podsumowując opracowany przez Doktoranta autorski modelowy układ badawczy okazał się niezwykle przydatny w badaniach nad biosyntezą i akumulacją karotenoidów u marchwi. Doktorant wykorzystując ten układ uzyskał szereg oryginalnych i ciekawych wyników. O ich znaczeniu świadczy to, że praca w której opublikowano pierwsze wyniki badań, była już 16 razy cytowana. O przydatności opracowanego układu badawczego świadczy też fakt, że jest on wykorzystany w kolejnych pracach zespołu, a wyprowadzony kalus akumulujący karotenoidy okazał się szczególnie przydatny w badaniach nad strukturą kryształów karotenoidowych marchwi (kolejne 3 publikacje). Należy podkreślić, że Doktorant na potrzeby realizacji części badań pozyskał własny projekt badawczy i stypendium wyjazdowe oraz podjął współpracę z kilkoma ośrodkami badawczymi. To wszystko świadczy o dużym zaangażowaniu Doktoranta w realizowane prace badawcze i szybkim rozwoju naukowym.

Pytania do pracy

Praca jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, co potwierdza fakt, że wyniki zostały opublikowane w recenzowanych pismach o znaczących współczynnikach oddziaływania, niemniej mam kilka pytań związanych z tematyką rozprawy.

1. W pracy wykorzystane zostały trzy różne metody analityczne pozwalające na oznaczanie karotenoidów w tkankach roślinnych – UPLC, HPLC i metoda spektrofotometryczna. Jakie są zalety i wady tych metod? Jakie są zalety metody UPLC w porównaniu z HPLC?
2. W pracy badano ekspresję genów związanych z metabolizmem karotenoidów, ale nie badano ekspresji genów kodujących dioksygenazy karotenoidów, które są związane z degradacją tych związków. Czy w korzeniach marchwi dochodzi do degradacji karotenoidów z udziałem tych enzymów? Ile genów dioksygenaz karotenoidów zidentyfikowano w genomie marchwi? Czy wiadomo w jaki sposób ewoluowały?
3. Doniesienia literaturowe mówią o próbach wykorzystania zawiesin komórkowych marchwi w produkcji rekombinowanych białek. Czy podejmowano próby uzyskania zawiesin komórkowych z pomarańczowego kalusa? Czy kalus ten mógłby znaleźć zastosowanie biotechnologiczne?

Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Tomasza Oleszkiewicza dotyczy aktualnej i konkurencyjnej problematyki badawczej jaką jest poznanie mechanizmów biosyntezy i akumulacji karotenoidów u roślin. Doktorant opracował oryginalny układ badawczy, który okazał się niezwykle przydatny nie tylko w badaniach nad metabolizmem karotenoidów, ale także w badaniach nad biogenezą plastydów czy też kryształów karotenoidowych. Uzyskane wyniki są oryginalne, a opracowany układ modelowy jest wykorzystywany w kolejnych pracach zespołu, co potwierdza jego dużą wartość. Doktorant opanował i skutecznie połączył w swej pracy techniki badawcze współczesnej biologii eksperymentalnej i biotechnologii roślin pokazując, że potrafi definiować i rozwiązywać problemy badawcze oraz krytycznie analizować i publikować uzyskane wyniki. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe elementy stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na bardzo wysoką wartość naukową pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski