



Katowice, 29.12.2021

Dr hab. Alexander Betekhtin, prof. UŚ
Zespół Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia 4.01.2022r
WBO-D 520-1.1/2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. inż. Tomasza Oleszkiewicza**

**Tkanka kalusowa jako układ modelowy do badania biosyntezy i akumulacji
karotenoidów u marchwi uprawnej (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*)**

Przestawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. inż. Tomasza Oleszkiewicza została wykonana na Uniwersytecie Rolniczym im. Hugona Kołłątaja w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Rafała Barańskiego. Badania przeprowadzono w ramach projektów OPUS 5 kierowanego przez prof. dr hab. Rafała Barańskiego oraz Preludium 16 kierowanego przez Doktoranta, finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki. Warto też podkreślić, że w trakcie realizacji pracy doktorskiej mgr inż. Oleszkiewicz otrzymał stypendium doktoranckie finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie ETIUDA 7.

Rozprawa doktorska jest oparta na trzech spójnych tematycznie publikacjach, które ukazały się w latach 2018-2021 (wg chronologii zamieszczenia ich w rozprawie):

1. **Oleszkiewicz T.**, Klimek-Chodacka M., Milewska-Hendel A., Zubko M., Stróż D., Kurczyńska E., Boba A., Szopa J., Baranski R., Unique chromoplast organization and carotenoid gene expression in carotenoid-rich carrot callus. *Planta* 2018, 248, 1455–1471
<https://doi.org/10.1007/s00425-018-2988-5>, **IF2018: 3,060**;



2. **Oleszkiewicz T.**, Kruczek M., Baranski R., Repression of carotenoid accumulation by nitrogen and NH₄⁺ supply in carrot callus cells *in vitro*. *Plants* 2021, 10, 1813 <https://doi.org/10.3390/plants10091813>, **IF2020: 3,935**;

3. **Oleszkiewicz T.**, Klimek-Chodacka M., Kruczek M., Godel-Jędrychowska K., Sala K., Milewska-Hendel A., Zubko M., Kurczyńska E., Qi Y., Baranski R., Inhibition of carotenoid biosynthesis by CRISPR/Cas9 triggers cell wall remodelling in carrot. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 6516 <https://doi.org/10.3390/ijms22126516>, **IF2020: 5,923**.

Należy zaznaczyć, że publikacje wchodzące w skład rozprawy podlegały już wnikliwemu procesowi merytorycznej recenzji przez niezależnych recenzentów będących ekspertami w ich tematyce, którzy docenili wartość prezentowanych wyników. W związku z powyższym, w mojej recenzji koncentruję się na ogólnej ocenie badań przeprowadzonych przez Doktoranta oraz formalnej ocenie rozprawy doktorskiej.

Pierwsza praca wchodząca w skład rozprawy została opublikowana na łamach czasopisma *Planta*, posiadającego wg Clarivate współczynnik wpływu z roku opublikowania pracy (**IF2018**) równy **3,060** oraz liczbę punktów **MEiN** równą **100**. Kolejne prace zostały zamieszczone w czasopiśmie grupy *Molecular Diversity Preservation International (MDPI)* i opublikowane w czasopiśmie *Plants* (**IF2020=3,935** i **70** punktów **MEiN**) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (**IF2020=5,923** i **140** punktów **MEiN**). Suma punktów wg **MEiN** za wyżej wymienione publikacje wynosi **310**, a sumaryczny współczynnik wpływu - **prawie 13**. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem, a w pracy nr 2 – także autorem korespondencyjnym. Wszystkie przedstawione publikacje mają charakter prac eksperymentalnych. Dorobek punktacyjny oraz wysoki współczynnik wpływu świadczą o bardzo dobrym warsztacie naukowym Doktoranta. Wkład Pana mgr. inż. Oleszkiewicza w przygotowanie publikacji składających się na rozprawę doktorską został określony w oświadczeniach współautorów, które zostały ujęte na końcu rozprawy. Wkład Doktoranta w powstanie tych prac uważam za dobry, biorąc pod uwagę jego pozycję wśród autorów. Jednak w związku z tym, że publikacje są autorstwem wielu osób i niektórzy współautorzy deklarowali podobny wkład, oczekiwałbym lepszego skonkretyzowania prac badawczych

wykonanych przez Doktoranta. Dotyczy to szczególnie technik takich jak TEM, immunocytochemia oraz przygotowania wektorów CRISPR/Cas9 z wklonowanym gRNA. Nie jest dla mnie jasna deklaracja jednego z autorów, który napisał, cytując: „my contribution was to provide knowledge and methodology for the construction of CRISPR vectors” oraz "nadzorowałem tworzenie wektorów CRISPR/Cas9”. Z tego co mi wiadomo, wektory są dostępne komercyjnie, a metodyka wklonowania w nie gRNA (bardzo szczegółowa) opublikowana została w Lowder *et al.* 2015 (doi: 10.1104/pp.15.00636). Proszę Doktoranta o komentarz w tej sprawie.

W pracy nr 3 pokazana została lokalizacja epitopów pektynowych, AGP i ekstensyn w komórkach kalusa, - strzałkami zaznaczona została lokalizacja tych epitopów w ścianie komórkowej. Na jakiej podstawie możemy wnioskować o lokalizacji tych epitopów w ścianie komórkowej, jeśli nie zostało przeprowadzone rutynowe barwienie ściany komórkowej za pomocą, na przykład, calcofluor czy też fast red 23? Barwniki te pozwalają wybarwić celulozę i pomóc w zrozumieniu lokalizacji tych epitopów. Proszę Doktoranta o komentarz w tej sprawie. **Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają ważnej roli mgr. inż. Oleszkiewicza w powstanie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.**

Rozprawa doktorska liczy 113 stron wraz z oświadczeniami współautorów publikacji. Zawiera ona 12 rozdziałów: *wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej; wykaz używanych skrótów; streszczenie w języku polskim i angielskim wstęp; cel; hipotezy i zadania badawcze; materiały i metody; omówienie wyników przeprowadzonych badań (otrzymanie i charakterystyka modelowego kalusa o pomarańczowej barwie; wpływ składu pożywki mineralnej na akumulacje karotenoidów w kalusie marchwi; rola paralogów fitoenu w pomarańczowym kalusie marchwi); podsumowanie i wnioski; literatura; publikacje stanowiące rozprawę doktorską; oświadczenia autorów publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej.*

Wstęp został napisany w sposób przejrzysty i przystępny. Ma prawidłową strukturę, zawartość merytoryczna tego rozdziału została dobrze przemyślana. Doktorant charakteryzuje marchew uprawną oraz ocenia ważność tego gatunku dla ludzkości. Następnie Doktorant opisuje karotenoidy oraz mechanizm ich biosyntezy. Rozdział zakończony jest

przedstawieniem mechanizmu działania techniki CRISPR oraz zastosowania tej techniki do edycji genomów roślin.

Głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie modelowego systemu i jego wykorzystanie do badania funkcji genów związanych z biosyntezą i akumulacją karotenoidów oraz powiązanych procesami w komórkach marchwi w warunkach kultury *in vitro*. Cel pracy został trafnie określony i dobrze sformułowany. W pracy doktorskiej postawiono cztery hipotezy badawcze, które następnie były weryfikowane. W celu weryfikacji tych hipotez, doktorant wyznaczył i zrealizował pięć zadań badawczych. Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej opisuje materiały i metody badawcze. Choć został on napisany syntetycznie to zawiera wszystkie informacje na temat metod zastosowanych w doświadczeniach. W kolejnej części rozprawy Doktorant omawia wyniki przeprowadzonych badań.

Za najważniejsze osiągnięcie badawcze Doktoranta uważam uzyskanie linii marchwi o zwiększonej zawartości karotenoidów. Doktorant zastosował w swoich pracach badawczych szereg technik mikroskopowych, takich jak mikroskopia jasnego pola, mikroskopia polaryzacyjna i mikroskopia elektronowa. Za pomocą ultrasprawnej (UPLC) oraz wysoko sprawnej (HPLC) chromatografii cieczerwowej i metod spektrofotometrycznych Doktorant oznaczył zawartość karotenoidów. Na szczególnie wyróżnienie zasługują wyniki otrzymane za pomocą techniki CRISPR/Cas9. Jest to technika niezwykle ważna, bo pozwala w szybki i precyzyjny sposób uzyskać edytowanie linii kalusa bądź roślin. Za jej pomocą Doktorant wykazał, że gen *PSY2* jest ważny dla biosyntezy karotenoidów w analizowanych liniach kalusa marchwi. Poza tym, mutacja wprowadzona w ten gen wpływała na ekspresję paraloga *PSY1*. Wszystko to wskazuje na doskonale opanowany warsztat metodyczny Doktoranta.

Pod względem merytorycznym oceniam pracę wysoko. Założenia projektu doktorskiego są dobrze przemyślane i w pełni zrealizowane. Wybór tematyki badawczej uważam za słuszny, niezwykle ważny i perspektywiczny. Warto podkreślić, że eksperymenty na kalusie gatunku rośliny modelowej w kulturze *in vitro* pozwoliły na przeprowadzenie dodatkowych badań, które wykraczają poza zakres rozprawy doktorskiej. Współpraca z Uniwersytetem Jagiellońskim oraz Polską Akademią Nauk dała szansę na przeprowadzenie badań i opublikowaniu ich wyników w prestiżowych czasopismach, takich jak *Spectra Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (IF2018=2,653, MEiN=100 pkt.), *Methods in*



Molecular Biology oraz *Angewandte Chemie International Edition* (IF2019=12,102, MEiN=200 pkt.). W wyżej wymienionych publikacjach Doktorant jest współautorem, a w jednej pracy pierwszym autorem.

Na koniec kieruję do Doktoranta kilka pytań dotyczących pracy, prosząc o odpowiedź w trakcie publicznej części obrony doktorskiej:

1. W pracy doktorskiej znajduje się informacja, że pomarańczowy kalus zawiera komórki merystematyczne oraz embriogenne. W publikacji nr 1 napisane jest "Our preliminary experiments showed that attempts of plant regeneration using a modified MS medium, the R medium, led to a visually paler color of callus due to a reduced carotenoid accumulation in comparison to callus grown on the B5-based BI medium.". W publikacji nr 2 pojawia się informacja, że kalus formuje struktury proembriogenne oraz zarodki na wczesnych stadiach rozwoju, a nie zostały pokazane żadne wyniki histologiczne potwierdzające ten fakt. Proszę o szczegółowy komentarz o możliwych przyczynach braku zdolności do dalszego rozwoju powstałych zarodków somatycznych.

2. Czy coś jest wiadomo na temat zawartości DNA w komórkach modelowego kalusa, porównując go do eksplantatu? Jak długo w trakcie hodowli kalusa utrzymuje się tak mocna barwa (kalus d-o) oraz wysoka zawartość karotenoidów? Czy wraz z czasem trwania kultury następuje utrata tego koloru i w konsekwencji spadek zawartości karotenoidów?

3. W nawiązaniu do wniosku 8 "Całkowite zahamowanie akumulacji karotenoidów w komórkach kalusa marchwi powoduje zmiany w składzie ściany komórkowej, zmniejszenie zawartości metylestryfikowanych pektyn oraz białek arabinogalaktanowych, co wskazuje na związek między metabolizmem karotenoidów i składem ściany komórkowej." Chciałbym zapytać, jakie inne techniki badań ściany komórkowej może Doktorant zaproponować, żeby bardziej precyzyjnie stwierdzić zachodzące zmiany? Czy zastosowane przeciwciała są specyficzne tylko do wybranych epitopów i z czym był związany wybór tych przeciwciał?

4. W swojej pracy Doktorant zastosował endonukleazę T7E1, jednak zastosowanie tej endonukleazy było początkowo używane do wykrywania mutacji off-target, ale test ten ma słabą czułość (na przykład nie może wykryć mutacji off-target, które występują z częstotliwością <1%). Poza tym zastosowanie tego testu na dużą skalę nie jest opłacalne. Jak

narzędzia może Doktorant zaproponować, żeby zmniejszyć czy całkowicie zlikwidować tak zwane mutacje off-target?

5. Jakie są dalsze plany wykorzystania uzyskanych linii kalusa? Czy są jakiś plany co do wykorzystania aplikacyjnego?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca 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*)” spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym art. 179 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, które stanowi, że przewody doktorskie, (...), wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art. 1, są przeprowadzane na zasadach dotychczasowych, z tym że jeżeli nadanie stopnia doktora, (...), następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień (...) nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art. 5 ust. 3 tej ustawy. **W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny - Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr. inż. Tomasza Oleszkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wartościowe, nowatorskie i opublikowane wyniki zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenionej przeze mnie rozprawy doktorskiej.**

Dr hab. Alexander Betekhtin, prof. UŚ

Alexander
Betekhtin

