

Dr hab. Beata Myśków, prof. ZUT
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Machaj,

pt. „Strukturalna i funkcjonalna analiza genomów marchwi uprawnej i dzikiej
pod kątem identyfikacji genetycznych determinant rozwoju korzenia
spichrzowego”

Praca doktorska mgr inż. Gabrieli Machaj przedłożona do recenzji składa się z trzech anglojęzycznych publikacji, opatrzonych wstępem napisanym po polsku. Artykuły opublikowano w dwóch renomowanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, których wartości współczynnika wpływu *Impact Factor* (IF) w latach wydania prac (2017, 2018 i 2021) wynosiły 4,298 (*Frontiers in Plant Sciences*) oraz 3,600 i 3,759 (*Genes*). Sumaryczny 4./5. letni IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 13,008, a suma ich cytowań odnotowana w bazie Web of Science pod koniec lipca 2021 roku wynosiła 28. Wszystkie prace miały charakter wieloautorski, ale w każdej z nich Doktorantka odegrała dominującą rolę przy opracowywaniu koncepcji i realizacji badań oraz analizie wyników i ich ostatecznej interpretacji, a także podczas pisania tekstu. Procentowy wkład Gabrieli Machaj w przygotowanie poszczególnych publikacji wynosił 25% - w pracy zgłoszonej przez ośmiu współautorów, 55% - w pracy pięcioautorskiej i 70% - w pracy autorstwa Doktorantki i Jej promotora. Udział w powstaniu artykułów został potwierdzony stosownymi oświadczeniami złożonymi przez pozostałych współautorów.

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Biologii Roślin, Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Dariusza Grzebelusa, jako promotora i dr inż. Alicji Macko-Podgórn, prof. UR, jako promotora pomocniczego.

TEMATYKA BADAWCZA

Przedmiot badań stanowiły marchew uprawna i dzika. Gatunek uprawny jest jednym z najważniejszych warzyw korzeniowych na świecie. Światowa powierzchnia upraw zajmuje ok. 1,1 mln ha, z czego ok. 22 tys. ha znajduje się w Polsce (FAOSTAT, 2019). Znaczenie wynikające z walorów żywieniowych i kulinarnych gatunku są nie do przecenienia, stąd

zainteresowanie naukowe marchwią jest całkowicie uzasadnione. Choć wybór materiału zapewne nie leżał w gestii Doktorantki, to z pewnością był on naturalną konsekwencją wyboru jednostki naukowej i promotora doktoratu, który specjalizuje się w badaniach nad tym gatunkiem. Podjęte przez Doktorantkę badania dotyczą genetycznego podłoża rozwoju korzenia spichrzowego i stanowią wyodrębniony element szerszej koncepcji badawczej obejmującej zarówno kompleksową charakterystykę genomu marchwi uprawnej jak i analizę procesów prowadzących do jej udomowienia.

Realizacja przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo jest uzasadniona tematyką badań.

STRUKTURA PRACY I STRONA JĘZYKOWA

Doktorat obejmuje trzy artykuły liczące 13, 20 i 17 stron, podzielone zgodnie z wymogami edytorskimi czasopism na standardowe rozdziały o klasycznym układzie: Wprowadzenie, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja (osobno we *Frontiers in Plant Sciences* lub łącznie w *Genes*), Wnioski oraz Spis literatury. Artykuły poprzedza polskojęzyczna opisowa część pracy, w której zawarto: Wykaz używanych skrótów i terminów, Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, Streszczenie i słowa kluczowe (także w wersji angielskiej), Wstęp, Hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań, Materiały i metody, Najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań, Podsumowanie i wnioski oraz Spis literatury. To syntetyczne ujęcie tematyki rozprawy liczy 32 strony. Napisane jest poprawnym i przystępnym językiem, choć w tekście pojawiły się nieliczne drobne błędy natury interpunkcyjnej (przecinki po członie inicjalnym „ponadto”, brak przecinka przed „a” między zdaniem współrzędnymi) i tak zwane „literówki”. Większość błędów natury edytorskiej nie ma istotnego znaczenia dla odbioru pracy; jeden z nich jednak niefortunnie znalazł się w opisie wyników i jest to błędnie oznaczony symbol etapu rozwoju rośliny (str. 19, akapit 3, wers 5-6: **T2 vs T2**).

Dyskusyjną kwestią jest według mnie używanie anglojęzycznych zwrotów specjalistycznych. Ponieważ jestem zwolenniczką stosowania zapisów spolszczonych, spodobała mi się pisownia wyrazu „locus” z użyciem litery k (lokus), z którą spotkałam się po raz pierwszy. Z kolei nie budzi mojego entuzjazmu zachowanie anglojęzycznej pisowni w odniesieniu do splajsingu („*splicing*’u”) i genów podlegających podwyższonej lub obniżonej ekspresji („*geny up/down-regulated*” lub „*geny up/down-regulowane*”). Jak jednak zaznaczyłam wcześniej te rozważania językowe są nie tyle uwagami krytycznymi do Doktorantki, ile raczej przyczynkiem do dyskusji o polskiej pisowni angielskich naukowych zapożyczeń.

Kolejna uwaga natury językowej odnosi się do sformułowania dotyczącego „mapowania genu do chromosomu”, które pojawia się w kilku miejscach pracy. W mojej opinii poprawnym zwrotem jest „(z)mapowanie genu na chromosomie” lub „przypisanie genu/markera do chromosomu”. Także niepoprawny wydaje się zwrot „na dystalnej części długiego ramienia chromosomu” (punkt pierwszy podsumowania i wniosek końcowy nr 1, str. 25 i 26). Powinien on brzmieć „w dystalnej części długiego ramienia chromosomu”.

OCENA TREŚCI

Tytuł rozprawy doktorskiej jest adekwatny do zawartych w niej treści. We wstępie rozprawy, podzielonym na kilka podrozdziałów, zawarto przegląd najważniejszych zagadnień dotyczących tematyki badawczej. Pokróćce omówiono znaczenie marchwi uprawnej, podano charakterystykę korzenia spichrzowego, scharakteryzowano odmiany i typy marchwi uprawnej, opisano jej genom, omówiono proces udomowienia wychodząc od opisu marchwi dzikiej i dalej skupiając się głównie na wiedzy dotyczącej genetycznych determinant udomowienia marchwi. Treść rozdziału nie przytłacza nadmiarem informacji, dobrze wprowadza w tematykę pracy i wzbudza zainteresowanie czytelnika. Jednocześnie stanowi dostateczne uzasadnienie zajęcia się problematyką badań. W zakończeniu wstępu wskazano na podstawowy charakter badań, słusznie sugerując także możliwości wykorzystania zdobytej wiedzy w aspekcie praktycznym, na potrzeby hodowli marchwi i innych roślin z rodziny *Apiaceae*.

Po rzeczowym, dobrze opracowanym przeglądzie literatury zawartym we wstępie następuje rozdział „Hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań”. Formułowanie hipotez stanowi zwykle znaczne wyzwanie dla młodego adepta nauki. Doktorantce udało się celnie wysunąć cztery hipotezy oraz nakreślić główne cele badań prowadzące do ich zweryfikowania. Cele te określono jako identyfikację i charakterystykę: 1) rejonu genomu z chromosomu 2 będącego pod presją selekcyjną w trakcie udomowienia, 2) genów podlegających różnicowanej ekspresji w siewkach i korzeniach gatunku uprawnego i dzikiego, 3) rodziny genów AHL w marchwi uprawnej. Cele główne zrealizowano poprzez cztery cele pośrednie wymienione w rozdziale „Hipotezy badawcze i cele prowadzonych badań”, a efekty ich realizacji opisano w trzech kolejnych publikacjach tworzących rozprawę,

Rozdział „Materiały i metody” napisany został bardzo zwięźle, z zaznaczeniem, iż szczegółowe opisy metodyczne znajdują się w każdej z trzech publikacji jako wyodrębnione rozdziały. Był to według mnie zabieg w pełni uzasadniony, pozwolił bowiem uniknąć nieproporcjonalnego rozbudowania tej części pracy i powielania dokładnych informacji ujętych w załączonych artykułach. Najważniejsze informacje metodyczne zostały podane w formie wymienienia użytych materiałów i metod.

Pani mgr inż. Gabriela Machaj przeprowadziła w swojej pracy naukowej zróżnicowane analizy z zakresu fenotypowania i genotypowania, stosowała metody molekularne (*long-PCR*), opanowała obsługę specjalistycznych programów komputerowych m.in. do mapowania genetycznego (analiza sprzężeń i analiza QTL) oraz przeprowadziła liczne analizy bioinformatyczne. Szczególne wrażenie sprawia różnorodność użytych narzędzi bioinformatycznych, zarówno programów komputerowych jak i baz danych, na potrzeby opracowania wyników z publikacji nr 3. W pracy przeprowadzono identyfikację i charakterystykę *in silico* białek AHL (InterProScan 5 v.5.38-76.0, MEME v.5.1.0, Expasy Server, CELO v.2.5, SignalP 5.0 Server), analizę filogenetyczną (MUSCLE, MEGA-X), analizę ekspresji (Kallisto v.0.44.0), analizę sieci powiązań i interakcji między genami (EBSeq v.1.12.0 R, Psych v.2.0.9 R, Igraph v.1.2.6 R, Cytoscape v.3.7.2, clusterMaker v.1.3.1) oraz przypisanie adnotacji funkcjonalnych (GO FEAD). Powyższe zestawienie pozwala wnioskować o bardzo dobrze opanowanym przez Doktorantkę warsztacie badawczym.

Doktorantka dysponowała odpowiednim do realizacji celów pracy materiałem roślinnym, który stanowiły linie i odmiany marchwi uprawnej, podgatunki marchwi dzikiej i populacja mapująca F₂ (*D. carota subsp. commutatus* × linia marchwi uprawnej 2874B). Zasadnie i umiejętnie wykorzystane zostały także publicznie dostępne dane sekwencyjne różnych materiałów roślinnych.

Wyniki badań omówiono syntetycznie, przedstawiając najważniejsze rezultaty w trzech podrozdziałach zgodnie z chronologią kolejnych publikacji. Polskojęzyczne opracowanie rozprawy nie zawiera graficznych i tabelarycznych zestawień, co jest uzasadnione charakterem rozprawy. Tekstowa forma jest jednak wystarczająca, aby zorientować się w zakresie badań i poznać zarys najważniejszych osiągnięć. W celu zapoznania się ze szczegółowym opisem wyników i dyskusją należy oczywiście sięgnąć do prac oryginalnych tworzących spójny cykl tematyczny. Lektura tych publikacji pozostawia czytelnika pod dużym wrażeniem. Badania doprowadziły do dokładnego poznania regionu *cult* z chromosomu 2, ustalenia budowy oraz funkcji genu *DcAHL1*, zaproponowanego jako kandydującego do udziału w regulacji tworzenia korzenia spichrzowego marchwi. Wszystkie wyniki stanowią znaczący wkład do wiedzy o genomie marchwi, genetycznym podłożu morfogenezy korzenia, funkcjach molekularnych i procesach biologicznych genów istotnych w rozwoju korzenia spichrzowego. Praca dostarczyła wielu cennych informacji z zakresu transkryptomiki *Daucus carota* poprzez przedstawienie, po raz pierwszy w literaturze, analizy porównawczej transkryptomów marchwi dzikiej i uprawnej w różnych stadiach rozwojowych. Dokładnie przeanalizowano rodzinę genów *AHL*, zidentyfikowano i scharakteryzowano *in-silico* białka AHL marchwi, przeprowadzono analizy filogenetyczne, zbadano profile ekspresji i skonstruowano sieci koekspresji genów. Wykryto i wskazano dodatkowe, poza wytypowanym we wstępnym etapie badań genem *DcAHL1*, geny *AHL* prawdopodobnie zaangażowane w rozwój korzenia spichrzowego marchwi.

Potwierdzeniem wysokiego poziomu badań i ich rzetelnego opracowania jest ranga czasopism, w których prace się ukazały. Pomimo niewątpliwie wyróżniającej jakości wszystkich publikacji pozwolę sobie na pewne uwagi do pracy nr 1. Próbując przeanalizować zagadnienie dotyczące struktury genu *DcAHLc1*, wskazanego jako gen determinujący grubość korzenia i ulegający presji selekcyjnej w trakcie udomowienia, natknęłam się na pewne niejasności. Prosiłabym Doktorantkę o wyjaśnienie zagadnień budzących wątpliwości podczas publicznej obrony doktoratu.

1. W zestawieniu tabelarycznym (Table 3) wskazane są SNP wykryte w sekwencji kodującej DCAR_008402 (gen *DcAHLc1*) obiektów dzikich i uprawnych marchwi. W tekście tej publikacji i w opisie tabeli mowa jest o trzech SNP niesynonimicznych różnicujących formy uprawne od dzikich, podczas gdy w tabeli występują jeszcze inne mutacje zmiany sensu (substytucje w pozycji 946 i 948 – prawdopodobnie dotyczące tego samego kodonu oraz trzynukleotydowy *indel* w pozycji 976-978). Dlaczego w tekście pracy nie zamieszczono informacji o tych zmianach? Nie zostały one także oznaczone jako zmiany niesynonimiczne w Tab. 3, choć mają one odzwierciedlenie w sekwencji aminokwasowej białka kodowanego przez *DcAHLc1*, co pokazano na rycinie (Figure 4).

2. Wśród zmian strukturalnych odpowiedzialnych za różnicowanie form dzikich od uprawnych wymieniana jest także insercja w sekwencji intronowej genu *DcAHLc1*, wykryta uprzednio (Macko Podgórn i wsp. 2014). Według autorów publikacji nr 1, obecność tej zmiany skutkuje prawdopodobnie alternatywnym splajsingiem, a konkretnie powstaniem dodatkowego egzonu (egzon 2) obecnego w formach uprawnych. Hipoteza ta została częściowo potwierdzona wykryciem obecności dwóch alternatywnych form transkryptów, jednak wariant z dodatkowym egzonem występował sporadycznie i nie różnicował form dzikich od uprawnych. Na rycinie (Figure 4) występuje on tylko w sekwencji modelowej genu (*DcAHLc1*) a nie w *DcAHLc1-c*. W mojej opinii przypisywanie akurat tej zmianie strukturalnej roli w różnicowaniu form dzikich od uprawnych jest w pracy albo nieco zbyt silnie akcentowane albo zbyt słabo uzasadnione. Pytanie, które chciałbym skierować do Doktorantki brzmi: A) Czy mimo małej częstości występowania izoformy transkryptu genu *DcAHLc1* z dodatkowym egzonem może ona mieć wpływ na zmiany w morfogenezie korzenia marchwi uprawnej? B) Czy jest możliwe, aby inne, nie tak duże zmiany strukturalne jak omawiana insercja w (np. SNP) mogły wpłynąć na zmianę funkcji genu? C) Jakie są sposoby na weryfikację możliwego wpływu zmian strukturalnych genu na jego funkcje?”

W trakcie lektury rozprawy nasunęło mi się także kilka spostrzeżeń i pytań odnoszących się do analizy QTL. Prosiłabym Doktorantkę o komentarz do nich podczas publicznej obrony doktoratu.

3. W pracy zabrakło informacji o zmienności fenotypowej badanej cechy. O skali różnic w grubości korzenia możemy wnioskować jedynie z pięknie wykonanych fotografii zamieszczonych w „Supplementary Figure 1” w publikacji nr 1.
4. W metodyce mapowania QTL nakierowanego na wykrycie *loci* związanych z przyrostem korzenia na grubość (publikacja nr 1) pojawiła się pewna sprzeczność. W jednym ze zdań podano, iż do określenia istotności QTL zastosowano wartości uzyskane z testów permutacji (liczba permutacji 500, poziom istotności 0,05). W kolejnym zdaniu znalazła się informacja, że potencjalny QTL uznawano za istotny, gdy wartość LOD przekraczała 2,5. Te dwa sposoby ustalania poziomu istotności QTL stosuje się zamiennie. Dlaczego więc po ustaleniu poziomu LOD w teście permutacji przyjęto stałą wartość progową $LOD > 2,5$?
5. Procent wariancji wyjaśnionej efektem poszczególnych QTL (PVE) został wyliczony według wzoru zamieszczono w publikacji nr 1 pod tabelą (Table 4). Czy celowo nie skorzystano z parametru R^2 (*partition of the variance explained by QTL*) wyliczanego w programie Win QTL Cartographer, stosowanym do wykrycia QTLi? W pracy zabrakło mi także wartości efektu addytywnego, który stanowi ważną informację o tym, jak wartość badanej cechy (grubość korzenia) zmienia się pod wpływem wariantów allelicznych danego QTLa.

W rozdziale zamykającym polskojęzyczną część rozprawy znalazło się podsumowanie pracy zawarte w ośmiu punktach oraz pięć wniosków końcowych. Wszystkie punkty trafnie oddają osiągnięcia opisane w rozprawie i dobrze porządkują najważniejsze efekty badań. Nie jestem jedynie w pełni przekonana co do zasadności użycia określenia „model” w punkcie trzecim podsumowania, w odniesieniu do stwierdzenia/odkrycia, że za zróżnicowane funkcje genu

DcAHLc1 w korzeniach marchwi dzikiej i uprawnej odpowiadają różnice na poziomie struktury a nie ekspresji.

Ostatnia drobna uwaga dotyczy oznaczenia genu *DcAHLc1*. W większej części pracy jest używany właśnie ten zapis. W publikacji nr 3 gen ten uzyskał nowy symbol (*DcAHL16*). W podsumowaniu powinny zatem znaleźć się oba symbole, przynajmniej przy pierwszej wzmiance o omawianym genie.

Spis literatury zawierający zestawienie zacytowanych w rozprawie prac świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz o umiejętności dokonania właściwego doboru i syntetycznego opracowania materiałów źródłowych. Do przygotowania polskojęzycznego opracowania wykorzystano 58 publikacji i trzy strony internetowe.

PODSUMOWANIE

Pracę doktorską, przygotowaną pod opieką promotora i promotora pomocniczego, można uznać za oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawę stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, obejmującej trzy publikacje. Jest to spójne opracowanie i dogłębna analiza wyodrębnionego zagadnienia (strukturalna i funkcjonalna analiza genomów marchwi uprawnej i dzikiej pod kątem identyfikacji genetycznych determinant rozwoju korzenia spichrzowego). Przeprowadzone badania zostały zaplanowane z rozmysłem i konsekwentnie zrealizowane z użyciem wielu aktualnych i nowoczesnych metod analitycznych oraz różnorodnych narzędzi bioinformatycznych. Rozprawa Gabrieli Machaj jednoznacznie wykazuje indywidualny wkład Kandydatki przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników. Tym samym praca spełnia wymogi zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Gabrieli Machaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z ponadprzeciętnym merytorycznym poziomem pracy wnioskuję o przyznanie pracy wyróżnienia.

Szczecin, 9 sierpnia 2021

Beata Myśków