

Radzików, 14. 07. 2021

Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk
Zakład Genomiki Funkcjonalnej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Radzików, 05-870 Błonie

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Machaj pt. „Strukturalna i funkcjonalna analiza genomów marchwi uprawnej i dzikiej pod kątem identyfikacji genetycznych determinant rozwoju korzenia spichrzowego”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Dariusza Grzebelusa w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie

Obiektem niniejszych badań jest znana z korzenia spichrzowego marchew uprawna (*Daucus carota* subsp. *sativus*), będąca jednym z najważniejszych warzywnych gatunków uprawnych na świecie. Jest ona również głównym obiektem badawczym w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii UR. Jednym z podstawowych zagadnień związanych z tym gatunkiem było poznanie genetycznych czynników warunkujących jej udomowienie. Poza aspektem poznawczym identyfikacja i charakterystyka istotnych genów związanych z procesem udomowienia może ułatwić selekcję istotnych cech w procesie hodowli. Do szeroko opisanych determinant udomowienia należą loci/geny kontrolujące syntezę karotenoidów, cukrów czy też geny zaangażowane w kontrolę czasu kwitnienia. Jednak głównym elementem udomowienia jest rozwój akumulującego duże ilości cukrów i karotenoidów korzenia spichrzowego. Doniesienia literaturowe na temat molekularnych podstaw rozwoju korzenia w marchwi uprawnej ograniczały się do identyfikacji genów kontrolujących gospodarkę wodną czy też fitohormonalną. Wcześniejsze badania zespołu prof. D. Grzebelusa przy wykorzystaniu platformy markerów DArT umożliwiły identyfikację 27 markerów sprzężonych z cechami udomowienia. Jeden z nich, marker *cult*, cechował się najwyższym współczynnikiem determinacji cechy udomowienia, sugerując jego związek z procesem rozwoju korzenia spichrzowego. Dlatego rejon genomu zaznaczony tym markerem stał się potencjalnym kandydatem do dalszych badań zainicjowanych przez Doktorantkę. Rozwiązanie tego ciekawego problemu stało się również łatwiejsze po

opracowaniu, we współpracy z zespołem prof. D. Grzebelusa genomu referencyjnego marchwi uprawnej (Iorizzo i in. 2016, Nature Genetics).

Rozprawa doktorska mgr inż. Gabrieli Machaj jest kompilacją trzech powiązanych tematycznie publikacji: Macko-Podgórni i in. 2017, Machaj i in. 2018, Machaj i in. 2021, które ukazały się kolejno we Frontiers in Plant Science i dwie w Genes (MDPI). W pierwszej pracy Doktorantka jest drugim autorem (pierwszym jest Promotor pomocniczy dr inż. A. Macko-Podgórni, prof. UR). W dwóch następnych pracach mgr inż. G. Machaj jest autorem pierwszym, przy czym ostatnia praca jest dwuautorska. Należy podkreślić, że czasopisma te mają wysoki współczynnik wpływu (IF), powyżej 4 i powyżej 3, co daje w sumie IF 11,657 (IF₅ 13,008). Udział Doktorantki w tych publikacjach wynosił odpowiednio 25%, 55% i 70%. W pierwszej z nich mgr inż. Gabriela Machaj brała udział w fenotypowaniu, genotypowaniu, analizach bioinformatycznych, mapowaniu loci QTL, analizach long-PCR oraz pisaniu części manuskryptu. W następnej pracy, poza częścią badawczą (przygotowanie materiałów do sekwencjonowania, analizy bioinformatyczne), Doktorantka współuczestniczyła w opracowaniu i interpretacji wyników oraz pisaniu publikacji. W ostatniej, dwuautorskiej jej udział był bardzo duży począwszy od pracy koncepcyjnej, poprzez prace doświadczalne jak i opracowanie, wizualizację i interpretację wyników aż do przygotowania manuskryptu.

Układ pracy doktorskiej jest typowy dla tego typu rozpraw. We wstępie Doktorantka zawarła podstawowe informacje o podgatunkach marchwi uprawnej oraz dzikiej i jej udomowieniu, genomie i genetycznych determinantach udomowienia. W dalszej części podała hipotezy badawcze i cele, przedstawiła krótko materiały i metody, najważniejsze wyniki, podsumowanie i wnioski oraz dołączyła publikacje, włączając oświadczenia współautorów o ich udziale w tych pracach.

Szczegółowe cele i hipotezy rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

Cele badawcze były zgodne tematycznie z wchodzącymi w skład pracy doktorskiej publikacjami. W pierwszej z nich (Macko-Podgórni i in. 2017) celem była charakterystyka rejonu genomu marchwi, który uległ silnej presji selekcyjnej w procesie udomawiania. Hipotetycznie założono, że różnice strukturalne w budowie genomów marchwi dzikiej i uprawnej są wynikiem selekcji w trakcie udomawiania i tym samym wyselekcjonowany w wyniku tej presji rejon zawiera geny warunkujące formowanie korzenia spichrzowego.

W drugiej pracy (Machaj i in. 2018) za pomocą różnicowej ekspresji przeprowadzonej w młodych roślinach i korzeniach marchwi dzikiej i uprawnej zidentyfikowano i scharakteryzowano geny ulegające zróżnicowanej ekspresji. Hipotetycznie założono, że w puli tych genów będą te, istotne dla procesu formowania korzenia spichrzowego.

Badania przeprowadzone i zamieszczone w trzeciej publikacji miały na celu charakterystykę rodziny genów *AHL* u marchwi uprawnej. Hipoteza badawcza stanowiła, że czynniki transkrypcyjne należące do tej rodziny biorą współudział w formowaniu korzenia spichrzowego. Realizacja powyższych celów badawczych wymagała: sekwencjonowania badanego rejonu chromosomu w genomach marchwi dzikiej i uprawnej, mapowania loci cech ilościowych (QTL) związanych z badaną cechą, sekwencjonowania transkryptomów obydwu gatunków marchwi oraz analizy struktury i ekspresji badanych genów i ich koekspresji z innymi. Stąd stosowane przez Doktorantkę metody były dosyć obszerne i obejmowały fenotypowanie, genotypowanie, mapowanie, analizy molekularne (RT-qPCR, NGS, RNAseq), bioinformatyczne.

W tej części doktoratu byłam trochę zaskoczona kolejnością; najpierw postawiono hipotezy a potem wyznaczono cele. Zwykle jest odwrotnie. Czy ta kolejność ma jakieś głębsze uzasadnienie?

Najważniejsze uzyskane wyniki

Opracowany i opisany we wcześniejszych badaniach przez zespół prof. D. Grzebelusa marker *cult*, różnicujący marchew dziką i uprawną został zmapowany i polimorficzny rejon tego markera został poddany analizie (Macko-Podgórni i in. 2017). Porównanie sekwencji genomowych tego rejonu w wielu genotypach reprezentujących obie grupy umożliwiła identyfikację polimorfizmów typu SNP i w dalszej kolejności wyodrębnienie rejonu różnicującego o długości 37000 par zasad (pz). Zidentyfikowano w nim 6 genów kodujących białka, z których jeden, należący do rodziny genów *AHL*, kodujących czynniki transkrypcyjne, został wytypowany jako kandydujący gen udomowienia. Autorzy wskazali na zmiany w kodonach sugerujące działanie selekcji oczyszczającej podczas udomawiania oraz występowanie alternatywnego splicingu/składania tego genu w roślinach dzikich i uprawnych. W wyniku mapowania cechy przyrostu korzenia na grubość zidentyfikowano dalszych 5 QTLi, z których jeden pokrywał się z rejonem udomowienia.

Identyfikacja genów zaangażowanych w proces formowania i rozwoju korzenia w marchwi uprawnej i dzikiej wymagała przeprowadzenia analizy różnicowej ekspresji genów w czasie

rozwoju korzenia spichrzowego (Machaj i in. 2019). Do badań wybrano tkanki w trzech stadiach rozwojowych: w 55 dniu, 110 dniu i 165 dniu po wysianiu, opisane jako young plants/siewki, developing roots/młode korzenie i mature roots/korzenie dojrzałe. Dobrze dobrany materiał badawczy jest bardzo ważny bo bezpośrednio przekłada się na otrzymane wyniki i ich interpretację. Stąd moje pytania: na jakiej podstawie wybrano te trzy stadia i czy 55-dniowe, młode rośliny były pobierane razem z liśćmi, jak wskazuje opis w publikacji? Jeżeli tak, to jakie mogą być tego konsekwencje? Dlaczego 55-dniowa roślina marchwi opisywana jest jako siewka?

W każdym ze stadiów zidentyfikowano setki genów o zróżnicowanej ekspresji w roślinach dzikich i uprawnych. Geny związane z fotosyntezą wykazywały wyższą ekspresję w trzech badanych stadiach roślin uprawnych w porównaniu z dzikimi. Czy Doktorantka mogłaby wskazać, jakie to mogły być geny/grupy genów, których ekspresja zachodząca w części podziemnej (dwa stadia) miała związek z fotosyntezą? Z kolei geny zaangażowane w formowanie ściany komórkowej ulegały wyższej ekspresji w marchwi uprawnej w porównaniu z dziką tylko w pierwszym stadium. Prześledzenie zmian poziomu ekspresji genów pomiędzy roślinami dzikimi i uprawnymi w czasie rozwoju korzenia umożliwiło pogrupowanie ich do trzech kategorii: regulowanych podobnie, specyficznych dla form uprawnych i specyficznych dla form dzikich. Wśród tych, biorących udział w rozwoju korzenia spichrzowego były geny z grupy czynników transkrypcyjnych, post-translacyjnych modyfikacji białek, sygnalizacji hormonalnej czy też sygnalizacji redox. Co ciekawe, analiza opisanego w pierwszej publikacji kandydującego genu udomowienia (DcAHLc1 z grupy czynników transkrypcyjnych) nie wskazała na wystąpienie istotnych różnic w poziomie ekspresji u form dzikich i uprawnych. Ten wynik nie stoi w sprzeczności z wcześniej proponowanym mechanizmem działania tego genu u obu form/podgatunków opartym na różnicach strukturalnych, warunkujących alternatywny splicing. Wyłoniono również inne grupy genów istotnie wpływających na wzrost korzenia spichrzowego marchwi, jak te biorące udział w regulacji cyklu komórkowego i mitozy, transporcie wody (akwaporyny), metabolizmie cukrów i skrobi, fotosyntezie czy też syntezie karotenoidów. Wyniki potwierdzają, że zaproponowany wcześniej model syntezy karotenoidów jest ściśle związany z genami fotosyntezy fotosystemów I i II.

W trzeciej, bardzo samodzielnej pracy Doktorantki, przy współpracy z Promotorem, przeprowadzona została charakterystyka rodziny genów *AHL* z naciskiem na identyfikację tych,

które mogą być zaangażowane w rozwój korzenia spichrzowego (Machaj i Grzebelus 2021). W genomie referencyjnym marchwi zidentyfikowano 47 genów, które, za pomocą analizy filogenetycznej dla marchwi i rzodkiewnika przyporządkowano do kładów i subkładów. W większości (37) ich białka wykazywały lokalizację jądrową. Dla niektórych sugerowano lokalizację w błonie plazmatycznej, chloroplastach i przestrzeniach międzykomórkowych, ale tylko jeden z nich posiadał peptyd sygnałowy (DcAHL9). Ze względów funkcjonalnych (analiza ekspresji) geny *AHL* podzielono na tkankowo-specyficzne (25 genów), konstytutywne (19 genów) i nieaktywne (w danych tkankach i warunkach eksperymentalnych; 3 geny). Podlegały one również regulacji rozwojowo-zależnej. W wyniku klastrowania autorzy wyodrębnili subklaster ośmiu genów ulegających ekspresji w korzeniach z czego trzy były silnie specyficzne dla tego organu. Wcześniej skonstruowaną sieć koekspresji uzupełniono o geny *AHL*. Analiza ontologii genów pozwoliła na wyodrębnienie i przybliżone określenie funkcji najważniejszych genów regulatorowych w dwóch klastrach zawierających geny *AHL*. Geny te ulegały koekspresji z genami biorącymi udział w procesie morfogenezy korzenia co wskazuje na ich udział w regulacji rozwoju korzenia spichrzowego.

Najważniejsze osiągnięcia

1. Lokalizacja i charakterystyka rejonu udomowienia *cult* marchwi uprawnej oraz identyfikacja ważnego genu udomowienia należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych *AHL*.
2. Zaproponowanie modelu funkcjonowania genu udomowienia w oparciu o jego strukturę i analizy ekspresji.
3. Charakterystyka całej rodziny genów *AHL* w genomach marchwi dzikiej i uprawnej i wyodrębnienie tych, zaangażowanych w formowanie korzenia spichrzowego.
4. Wykazanie, że w regulację rozwoju korzenia spichrzowego jest zaangażowanych wiele różnych grup genów regulujących różne jego aspekty i fazy rozwojowe.

Komentarze i uwagi krytyczne

W części opisowej nt. genomu nie zacytowano m.in. publikacji zespołu Grzebelus i in. 2016; na stronie 13 pracy podano złą datę publikacji Grzebelus i in. (nie 2013 ale 2014). Sformułowanie „mieszańce (F₂)” jest niepoprawne. Prawidłowo jest to pokolenie (potomne) F₂, nie mieszańcowe jak F₁ ale segregujące. Mogę się domyślać co Doktorantka chciała powiedzieć

przez zapisane sformułowanie w skrócie. Należało to jednak opisać szerzej, uwzględniając pokolenie F₁. Proszę o komentarz.
 Sugerowałabym używać poprawnych sformułowań w języku polskim, czyli nie „up-regulowane” (w przypadku ekspresji genów) ale ulegające wyższej ekspresji.
 Nie mam innych poważniejszych zastrzeżeń do oceny formalnej i merytorycznej.


Podsumowanie oceny

Wyniki badań przedstawione w cyklu trzech publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej mgr inż. Gabrieli Machaj są oryginalne i wnoszą nową wiedzę na temat genetycznych czynników rozwoju korzenia spichrzowego marchwi uprawnej. Udział badawczy i merytoryczny Doktorantki wzrasta znacząco w kolejnych publikacjach, co świadczy pozytywnie o jej rozwoju i coraz większej samodzielności. Jakość badań jest wysoka, co potwierdza również ranga czasopism, w których opublikowano wyniki. Zastosowano w nich wiele właściwie dobranych technik badawczych. Wnioski są prawidłowe.

Stwierdzam, że recenzowana praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Z powyższych względów wnoszę do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego in. H. Kołłątaja w Krakowie o **dopuszczenie mgr inż. Gabrieli Machaj do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Wniosek o wyróżnienie doktoratu

Wyniki pracy są oryginalne i mają wysoką wartość merytoryczną czego potwierdzeniem jest ich publikacja w uznanych czasopismach naukowych. Zarówno badawczy jak i merytoryczny wkład Doktorantki w ich powstanie znacząco wzrastał, świadcząc o Jej szybkim rozwoju naukowym w ciągu ostatnich czterech lat. Mgr inż. G. Machaj opanowała i biegle posługiwała się różnorodnym warsztatem eksperymentalnym i bioinformatycznym. Jej ugruntowana wiedza w temacie umożliwiła jej na przeprowadzenie wnikliwej analizy, interpretacji i dyskusji wyników. Powyższe względy upoważniają mnie do wnioskowania o wyróżnienie tego doktoratu stosowną nagrodą


 Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk