Prof. dr hab. Jarosław Marszałek
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of University of Gdańsk
and Medical University of Gdańsk
ul. Abrahama 58, 80-307 Gdańsk
tel. 58 523 6313
E-mail: jaroslaw.marszalek@ug.edu.pl

Gdańsk 29.09.2025

Recenzji rozprawy doktorskiej

Imię i nazwisko kandydata: Natalia Elżbieta Żyła

Tytuł rozprawy doktorskiej: Dywergencja funkcjonalna i regulatorowa homologów genu *BnaHB6* w złożoności sieci transkrypcyjnej w warunkach deficytu wody u rzepaku (*Brassica napus* L.)

Promotor: dr hab. Danuta Babula-Skowrońska

Recenzent: prof. dr hab. Jarosław Marszałek

1. **Tematyka rozprawy**
   czy tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo:

   Celem rozprawy była odpowiedź na pytanie czy 4 geny kodujące czynnik transkrypcyjny BnaHB6 u rzepaku są zróżnicowane funkcjonalnie. W szczególności jaka jest ich rola w warunkach deficytu wody. Białka te należą do rodziny czynników transkrypcyjnych posiadających homeodomenę oraz zamek leucynowy (HD-Zip) odpowiedzialne odpowiednio za ich oddziaływanie z DNA oraz tworzenie dimerycznych kompleksów niezbędnych dla aktywności czynnika transkrypcyjnego. U modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* występuje tylko jedna ortologiczna kopia BnaHB6 (AtHB6) tak więc pytanie o zróżnicowanie funkcjonalne 4 kopii występujących u rzepaku jest uzasadnione. Występowanie wielu paralogicznych kopii genów jest typowe dla roślin czemu sprzyjają częste duplikacje genomów roślinnych oraz inne mechanizmy prowadzące do duplikacji genów. Nadal jednak nie wiemy jakie procesy ewolucyjne odpowiadają za utrzymanie zduplikowanych genów. Pytanie to jest szczególnie istotne w przypadku genów kodujących białka regulatorowe, takie jak czynniki transkrypcyjne, bowiem łatwo sobie wyobrazić, że ich dodatkowe kopie mogą zaburzać regulację ekspresji genów. Stwierdzam, że tematyka recenzowanej rozprawy dotyczy zagadnień istotnych dla rozwoju dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo a pytania postawione przez doktorantkę są uzasadnione. W szczególności skupienie się na roli badanych czynników transkrypcyjnych w adaptacji rzepaku do warunków stresowych takich jak deficyt wody.

2. **Wiedza kandydata**

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo:

Lektura rozprawy nie pozostawia wątpliwości, że doktorantka dysponuje wiedzą teoretyczną osoby ubiegającej się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne. W obszernym wstępie (44 strony) omówiła ewolucję genomów roślinnych, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia duplikacji genomów oraz przedstawiła znane mechanizmy ewolucyjne odpowiedzialne za utrzymanie zduplikowanych kopii genów. W kolejnym podrozdziale omówiła najpierw taksonomię i znaczenie gospodarcze rzepaku a w dalszej części znaczenie rzepaku jako modelowego gatunku w badaniach podstawowych i hodowli roślin ze szczególnym uwzględnieniem możliwości wykorzystania rzepaku, gatunku poliploidalnego, w badaniach ewolucji genomów roślinnych. Kolejne podrozdziały wstępu dotyczą roślinnych czynników transkrypcyjnych ich funkcji oraz mechanizmów działania oraz ewolucji. W końcowych podrozdziałach doktorantka skupiła się na czynnikach transkrypcyjnych HD-Zip I będących obiektem jej badań. Omówiła ich ewolucję u roślin lądowych ze szczególnym uwzględnieniem ewolucji rodziny tych białek u modelowej rośliny *A. thaliana*. Przestawiła znaczenie tych czynników w regulacji i rozwoju roślin zarówno w warunkach fizjologicznych jak też w stresie uwzględniając ich rolę w sygnalizacji hormonalnej, adaptacji do stresu abiotycznego i odpowiedzi na światło. Warto zauważyć, że doktorantka, jest współautorem pracy przeglądowej dotyczącej ewolucyjnych konsekwencji funkcjonalnego i regulatorowego zróżnicowania czynników transkrypcyjnych HD-Zip I – niewątpliwie wstęp do rozprawy doktorskiej był inspirowany tą publikacją.
Część metodyczna rozprawy nie pozostawia wątpliwości, że doktorantka dysponuje wiedzą teoretyczną niezbędną do samodzielnego przeprowadzenia badań przedstawionych w tej rozprawie. Posiada zarówno wiedzę z dziedziny bio-informatyka – zna programy komputerowe do analizy filogenetycznej oraz analizy sekwencji DNA w celu identyfikacji sekwencji regulatorowych jak również zna bazy danych niezbędne do przeprowadzenia tych analiz. Doktorantka dysponuje również wiedzą teoretyczną z dziedziny biologii molekularnej oraz biochemii roślin.

3. **Samodzielność kandydata**

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez osobę ubiegającą się o nadanie stopnia doktora:

Po lekturze rozprawy oraz dwóch publikacji, które powstały w oparciu o wyniki uzyskane przez doktorantkę, nie mam wątpliwości co do jej samodzielności naukowej. Opis metod stosowanych w badaniach, wyniki badań przedstawione w rozprawie oraz dyskusja tych wyników w oparciu o publikacje naukowe wskazują na samodzielność doktorantki.

4. **Oryginalność rozprawy**

ocena wraz z uzasadnieniem, czy rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej:

Nie mam również wątpliwości, że recenzowana rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiono w niej wyniki analiz filogenetycznych, porównania kompozycji domenowej badanych białek, porównanie ich aktywności transkrypcyjne z użyciem komórek drożdży, analiza poziomu ekspresji genów kodujących paralogi BnaHB6 w różnych tkankach, w fazach rozwojowych, w rytmie okołodobowym oraz w warunkach stresowych są oryginalne. Doktorantka wykazała różnice w ekspresji genów kodujących paralogi BnaHB6 co może świadczyć o ich post-duplikacyjnym zróżnicowaniu funkcjonalnym. Zróżnicowanie ekspresji genów powiązała z różnicami w sekwencjach regulatorowych obecnych w niekodującym 5' DNA (1500 pz powyżej startu transkrypcji). Dwie kopie genów z rzepaku charakteryzowały się mniejszą liczbą sekwencji regulatorowych niż ich ortolog z A. thaliana – co może tłumaczyć ich różne profile ekspresji opisane w tej rozprawie. Potwierdziła różnice w aktywności sekwencji regulatorowych zlokalizowanych w niekodującym 5'DNA BnaHB6 wprowadzając te sekwencje do genomu *A. thalina*. Wykazała również, że sekwencje DNA rozpoznawane przez paralogi BnaHB6 wpływają na ekspresję genów *A. thaliana*

oraz że ten wpływ jest zależny od stresu wywołanego niedoborem wody. Aby potwierdzić oddziaływanie paralogów BnaHB6 ze specyficznymi sekwencjami DNA in vivo, ponownie wykorzystała A. thalina oraz geny, których niekodujący 5'DNA zawierał sekwencje regulatorowe rozpoznawane przez BnaHB6. Stosując precypitację chromatyny w powiązaniu z ilościowym PCR potwierdziła wiązanie BnaHB6 do tych sekwencji. Następnie wykorzystując opisane w literaturze linie rzepaku posiadające zmutowany wariant jednego z paralogów (BnaC08HB6) wykazała wpływ tych mutacji na wzrost i morfologię roślin w warunkach stresu niedoboru wody oraz analizując transkryptom mutanta jego wpływ na ekspresję innych genów. Pokazała również zwiększoną oraz zmniejszoną ekspresję ponad 4 tysięcy genów, wykazując globalny wpływ czynników transkrypcyjnych z podrodziny BnaHB6 na transkryptom rzepaku. Analizując bazy danych pod kątem ontologii genów o zmienionym poziomie transkrypcji zakwalifikowała je do trzech głównych kategorii: procesy biologiczne, komponenty komórkowe i funkcje molekularne. Podsumowując doktorantka zastosowała różnorodne techniki oraz podejścia badawcze, aby wykazać, że paralogi BnaHB6 rzepaku są zróżnicowane funkcjonalnie. Ich ekspresja jest kontrolowana przez czynniki środowiskowe w tym niedobór wody oraz rytm okołodobowy. A mutacje w jednym z tych paralogów mają wpływ na wzrost i morfologię roślin oraz globalnie na ich transkryptom. Wyniki przedstawione w rozprawie są niewątpliwie oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego.

5. **Pytania i uwagi, na które Recenzent oczekuje odpowiedzi kandydata w czasie obrony:**

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań, na które chciałbym, aby doktorantka odpowiedziała w czasie publicznej obrony.

(a) We współczesnych analizach filogenetycznych wykorzystywane są najczęściej metody probabilistyczne takie jak maksymalna wiarygodność (Maximum Likelihood (ML)) oraz podejście Byesowskie (Bayesian Approach (BA)) tymczasem doktorantka ograniczyła się do metody dystansowej – najbliższych sąsiadów (Neighbour-Joining (NJ)). Proszę o wyjaśnienie tej decyzji oraz o krótkie przedstawienie zalet i ograniczeń metody NJ. Proszę również o komentarz czy zastosowanie metod takich jak ML/BA mogłoby pozwolić na identyfikację mutacji odpowiedzialnych za zróżnicowanie funkcjonalne paralogów BnaHB6.

(b) Przedstawione Ryc. 12B pokrewieństwo filogenetyczne 4 paralogów BnaHB6 z ich odpowiednikiem z *A. thaliana* jest kontrowersyjne – tylko 2 są siostrzane do genu *A. thaliana,* przy czym wsparcie bootstrap tej topologii jest stosunkowo niskie (45). Jak można zweryfikować tą topologię drzewa? Czy zastosowanie metod ML/BA albo poszerzenie analizy o homologii BnaHB6 z innych gatunków byłoby pomocne. Dodatkowo proszę o wyjaśnienie, dlaczego analizy filogenetyczne ograniczono do genów tylko dwóch gatunków roślin - rzepaku i *A. thalina*?

(c) Doktorantka kilkakrotnie w tekście pisze o procesach sub- lub neo- funkcjonalizacji jako o możliwych mechanizmach różnicowania funkcjonalnego paralogów BnaHB6, ale nie wyjaśnia, jak odróżnić te mechanizmy. Proszę o wyjaśnienie czym różni się sub- i neo- funkcjonalizacja i jakimi wynikami musielibyśmy dysponować, aby odpowiedzieć na pytanie, który z tych mechanizmów wyjaśnia zróżnicowanie funkcjonalne badanych białek?

6. **Inne spostrzeżenia dotyczące treści lub formy rozprawy:**

Lektura pracy nasunęła mi kilka uwag dotyczących jej formy i treści. Wstęp do rozprawy jest moim zdaniem zbyt obszerny (44 strony) znacznie wykraczając poza informacje niezbędne do zrozumienia celu badań, postawionej hipotezy badawczej oraz metodyki i strategii zastosowanej w badaniach. Przykładowo omówienie we wstępie wszystkich mechanizmów post-duplikacyjnego różnicowania genów podczas gdy w wynikach nie zweryfikowano żadnego z nich jest mylące w tym sensie, że „obiecuje zbyt wiele". Podobnie omówienie wielu czynników transkrypcyjnych roślin zamiast skupienie się na tych które badane są w pracy bardziej przeszkadza niż pomaga. Zamieszczenie we wstępie tabel przedstawiających liczbę genów kodujących czynniki transkrypcyjne HD-Zip z różnych gatunków roślin podczas gdy analizy filogenetyczne przedstawione w pracy ograniczają się do 2 gatunków jest mylące. Również skomplikowany schemat ewolucji genów tej rodziny nie jest potrzebny, gdyż zagadnienia te nie są poruszane w części wynikowej rozprawy. Oczywiście obszerny wstęp oparty o pracę przeglądową opublikowaną przez doktorantkę pomógł mi w odpowiedzi na pytanie o jej wiedzę

teoretyczną. Tym niemniej wiele informacji ze wstępu można było pominąć albo przenieść do dyskusji wyników.

Podział rozprawy na Wyniki i Dyskusję nie jest konsekwentny. Moim zdaniem w przypadku tak zróżnicowanych podejść i strategii badawczych lepiej byłoby połączyć Wyniki i Dyskusję w jeden rozdział, w którym przestawiono by: pytanie, na które mają odpowiedzieć planowane doświadczenia oraz wyniki (tak jak to jest obecnie w rozdziale Wyniki) a następnie przedyskutować je z literaturą (tak jak to jest obecnie w rozdziale Dyskusja). Praca kończyłaby się Podsumowaniem i perspektywami badawczymi, tak jak obecnie, które mogłyby być trochę bardziej obszerne. W obecnej formie czytając Wyniki brakuje nam ich interpretacji a Dyskusja zawiera zbyt wiele powtórzeń z Wyników w tym odnośniki do Rycin i Tabel. Całość rozprawy można by skrócić o 1/3.

W Dyskusji (str. 130) doktorantka pisze o wynikach analizy strukturalnej homologów genu BnaHB6 – tymczasem w całej pracy nie znalazłem ani jednej ilustracji pokazującej struktury tych białek. Autorka nie powinna mylić analizy strukturalnej z analizą składu domenowego badanych białek.

W pracy znalazłem również kilka niezręczności językowych:
...**intensywność** transkrypcji... (str. 39),
chaperony białkowe (str. 40) – termin angielski „chaperone" nie jest naukowy oznacza przyzwoitkę/opiekunkę – tłumaczymy go „białka opiekuńcze"
...białka **homeoboksowe**...(str. 45)
... program do **wielokrotnego** porównywania sekwencji... (str. 74) multiple sequence alignment – to zestawienie/dopasowanie wielu sekwencji
...**Wzory** ekspresji genów – legenda do Ryc. 28 – powinny być poziomy ekspresji...
...genów różnicowo **eksprymowanych**... (str. 117) – syntetyzowanych, wyrażanych itd.
... Dla każdej kombinacji genotypu i **warunku**... (str.117) – nie rozumiem co oznacza „warunku"
... analizę hierarchicznej **klasteryzacji** genów... (str. 122) – poprawny termin to analiza skupień lub grupowanie
...rytmu **cyrkadianowego**... (str. 126) – okołodobowego – taki termin jest używany w innych fragmentach rozprawy?
... w warunkach **chłodu**.. (str. 132)
... aktywność w warunkach **świetlnych**...(str. 132)
... linie z **nokautem** genu...(str. 134)
... wiązanie **TF-ów**.. (str. 138) – wiązanie czynników transkrypcyjnych – zrozumiałe i równie krótkie!

7. Ocena końcowa:

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Natalii Elżbiety Żyły** spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie **Natalii Elżbiety Żyły** do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora **w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo**.

data sporządzenia recenzji

29/09/2025

podpis recenzenta

KIEROWNIK ZAKŁADU
Biochemii Ewolucyjnej
prof. dr hab. Jarosław Marszałek