RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Natalii Żyły

pt. „Dywergencja funkcjonalna i regulatorowa homologów genu *BnaHB6* w złożoności sieci transkrypcyjnej w warunkach deficytu wody u rzepaku (*Brassica napus* L.)"

Rośliny, jako organizmy niezdolne do przemieszczania się, wykształciły złożony system reakcji na niekorzystne warunki środowiskowe. System ten obejmuje szereg mechanizmów działających na różnych poziomach, ale jednym z centralnych jego elementów jest szczególnie rozbudowana u roślin grupa białek określanych ogólnie jako czynniki transkrypcyjne. Są one kodowane przez liczne rodziny genów, spośród których wiele jest charakterystycznych tylko dla królestwa roślin. Funkcją czynników transkrypcyjnych jest regulacja ekspresji innych genów na poziomie ich transkrypcji, poprzez ich wiązanie się z określonymi motywami w rejonach regulatorowych (tzw. elementy *cis*-regulatorowe), skutkujące wzmocnieniem lub wyciszeniem ekspresji kontrolowanego genu.

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie Autorka opisała wyniki badań mających na celu poznanie mechanizmów działania czterech homologów genu *BnaHB6,* kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny HD-Zip I, obecnych w genomie rzepaku, w odpowiedzi na stres niedoboru wody. Analizy tego rodzaju są szczególnie trudne z uwagi na możliwą redundancję funkcjonalną, zwłaszcza w odniesieniu do gatunków poliploidalnych. Autorka przeprowadziła konsekwentnie zaplanowany cykl eksperymentów, który pozwolił na wyjaśnienie, przynajmniej w pewnym zakresie, tego kompleksowego mechanizmu, przyczyniając się tym samym do lepszego zrozumienia funkcji czynników transkrypcyjnych stanowiących przedmiot badań.

Struktura pracy

Rozprawa doktorska ma charakter obszernej (173-stronicowej) monografii naukowej, która została przygotowana w języku polskim. Została ona podzielona na rozdziały typowe dla opracowań tego typu w obszarze nauk o życiu, były to kolejno Wstęp, Hipoteza i cel naukowy pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i perspektywy badań, Wnioski oraz Literatura. Rozprawa została opatrzona stroną tytułową oraz uzupełniona o informację o źródle finansowania badań, podziękowania, spis treści, wykaz publikacji, w których Doktorantka pełniła

rolę współautorki, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis skrótów, a także suplement w formie płyty CD zawierającej wyniki analiz RNAseq.

We Wstępie, który obejmuje 48 stron, Autorka przedstawia bardzo szeroki kontekst swoich badań. W pierwszym podrozdziale dotyczącym zasadniczo ewolucji genomów roślinnych rozpoczęła narrację od początków życia na Ziemi, a następnie opisała zjawiska kształtujące genomy roślinne i bardziej szczegółowo scharakteryzowała możliwe mechanizmy ewolucji genów. W drugiej części Wstępu opisała rodzinę Brassicaceae, scharakteryzowała gatunki z rodzaju *Brassica* i ich szczególne znaczenie dla badań nad ewolucją genomów roślinnych, wreszcie szczegółowo omówiła rzepak, czyli gatunek będący obiektem prac eksperymentalnych. Trzecia część Wstępu to szerokie spojrzenie na roślinne czynniki transkrypcyjne, ich rolę, różnorodność i ewolucję, a także bardziej dokładny opis nadrodziny HD i roślinnej podrodziny HD-Zip I. Część ta została zakończona syntezą aktualnej wiedzy na temat genów kodujących czynniki transkrypcyjne HD-Zip I w gatunkach z rodzaju *Brassica*.

W dwustronicowym rozdziale Hipoteza i cel naukowy pracy Autorka, po krótkim komentarzu wprowadzającym, sformułowała dwie hipotezy badawcze, cel naukowy oraz cele szczegółowe, które, jak się wydaje, były doprecyzowywane na bieżąco w toku prowadzonych badań, wpisując się w cel główny.

Rozdział Materiał i Metody, obejmujący 29 stron, szczegółowo i wyczerpująco opisuje wszystkie zastosowane procedury badawcze, czemu pomaga jego podział na krótkie, precyzyjne podrozdziały.

W rozdziale Wyniki Autorka na 35 stronach obszernie opisała rezultaty prac eksperymentalnych. Rozdział został podzielony na podrozdziały charakteryzujące wyniki prac zrealizowanych w kolejnych etapach pracy doktorskiej. Dokumentują one zdolność Doktorantki do prowadzenia badań w obszarze nauk o roślinach przy wykorzystaniu szerokiej gamy nowoczesnych technik badawczych.

Dyskusja, obejmująca 23 strony, przedstawia uzyskane przez Autorkę wyniki w szerszym kontekście, podkreślając znaczenie tych wyników dla wzbogacenia wiedzy o ewolucji i mechanizmach działania homologów genu *BnaHB6* u rzepaku.

W krótkim, trzystronicowym rozdziale Podsumowanie i perspektywy badań Autorka proponuje model dywergencji funkcjonalnej badanej grupy czynników transkrypcyjnych oraz

formułuje kierunki dalszych badań. Uzupełnieniem tego rozdziału są Wnioski przedstawione w pięciu punktach.

Spis literatury obejmuje ponad 250 pozycji, które stanowią najważniejsze artykuły naukowe z wiodących światowych czasopism z ostatnich kilkunastu lat oraz ważne prace opublikowane wcześniej.

Streszczenia, umieszczone przed częścią opisową pracy, właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę.

Merytoryczna ocena pracy

Stan wiedzy przedstawiony w rozdziale Wstęp został zaprezentowany bardzo szeroko. Takie przekrojowe podejście świadczy o dostrzeganiu przez Doktorantkę szerokiego kontekstu swojej pracy, ale jednocześnie może prowadzić do nadmiernych uogólnień. Przykładowo, omawiając „paradoks wartości C" Autorka wskazała tylko ogólnie na znaczenie niekodującego DNA, nie uzupełniła jednak tej informacji o stwierdzenie, że za znaczne różnice wielkości genomów roślinnych odpowiadają przede wszystkim ruchome elementy genetyczne. Myląco określiła również liczbę zdarzeń duplikacji genomów w toku ewolucji – przytoczone na stronie 18 liczby odnoszą się do teoretycznej krotności genomów, która jest jednak wynikiem znacznie mniejszej liczby zdarzeń (od pięciu do siedmiu dla wskazanych gatunków). Z kolei na stronie 59 jest mowa o mutantach „syntetyzujących niedobory ABA", co ewidentnie jest wynikiem skrótu myślowego. W tabeli na stronie 17 podano również niepoprawną wielkość genomu ryżu, w rzeczywistości jest on ponad 10x mniejszy. Są to oczywiście drobne niedociągnięcia, które wskazuję z obowiązku recenzenta. Kolejne podrozdziały wstępu odnoszą się już bardziej bezpośrednio do tematyki pracy i stanowią bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej. Ostatnie podrozdziały, dotyczące rodziny HD u roślin, zostały w dużej mierze oparte na przeglądowej publikacji z roku 2023, przygotowanej wspólnie przez Doktorantkę i Panią Promotor, i dostarczają bardzo silnej podbudowy teoretycznej dla badań opisanych w dalszej części pracy.

Doktorantka podjęła się zadania polegającego na określeniu roli genów *BnaHB6* u rzepaku w odpowiedzi roślin na stres niedoboru wody. Postawiła Ona dwie hipotezy badawcze, mówiące o wpływie zmienności ewolucyjnej regionów *cis*-regulatorowych na dywergencję funkcjonalną genów *BnaHB6* oraz wynikającą z tego procesu specyficzną regulację genów docelowych w

odpowiedzi na warunki środowiskowe. Poznanie tych mechanizmów stanowiło cel naukowy pracy doktorskiej. Autorka zdefiniowała również cele szczegółowe, które, jak zakładam, przynajmniej częściowo były formułowane już w trakcie realizacji badań. Punktem wyjścia była identyfikacja w genomie rzepaku czterech homologów genu *AtHB6 A. thaliana*. Ich pozycja filogenetyczna, struktura oraz profile ekspresji, a także obecność potencjalnych elementów *cis*-regulatorowych związanych z odpowiedzią na stres abiotyczny, skłoniły Doktorantkę do skupienia uwagi na dwóch genach, *BnaA09HB6* i *BnaC08HB6*, na dalszych etapach badań. Określiła Ona aktywność promotorów tych genów w różnych organach i tkankach, a także wskazała na indukcję transkrypcji genu reporterowego w odpowiedzi na stresy abiotyczne i egzogenny ABA. Udowodniła, że geny te między innymi regulują ekspresję genów *BnaABF4* i *BnaDREB2*, bezpośrednio zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy. Przeanalizowała również odpowiedź mutanta rzepaku z wyłączonym genem *BnaC08HB6* na niedobór wody, wskazując na znaczenie tego genu dla adekwatnej reakcji rośliny na ten stres, zarówno na poziomie transkryptomu, jak również na poziomie fizjologicznym.

W toku realizacji badań Doktorantka wykorzystała szeroki zestaw technik laboratoryjnych, obejmujący ocenę aktywności transkrypcyjnej czynników transkrypcyjnych w heterologicznym układzie modelowym z wykorzystaniem transformacji drożdży *S. cerevisiae*, analizę ekspresji genów przy wykorzystaniu RT-qPCR oraz RNAseq, uzyskanie konstruktów zawierających gen reporterowy *uidA* pod kontrolą badanych promotorów i analizę ich funkcji po transformacji *A. thaliana* oraz identyfikację i charakterystykę mutacji knock-out genu *BnaC08HB6*. Na wszystkich etapach badania były wspierane analizami bioinformatycznymi, obejmującymi między innymi analizy filogenetyczne, predykcje miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych w promotorach oraz analizę transkryptomów, w tym identyfikację genów ulegających różnicowej ekspresji i analizę ontologii genów. Powyższa lista jednoznacznie wskazuje na bogaty warsztat naukowy, którym dysponuje Doktorantka i Jej wszechstronne doświadczenie w zakresie genetyki, genomiki i biologii roślin.

Z kolei szczegółowa i kompletna dyskusja uzyskanych wyników oraz pięć wieńczących rozprawę wniosków pozwala po raz kolejny podkreślić wiedzę i kompetencje Autorki w zakresie przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Logicznym podsumowaniem rozprawy było wskazanie przez Autorkę problemów, które wciąż wymagają odpowiedzi oraz zaproponowanie możliwych strategii badawczych umożliwiających uzyskanie tych odpowiedzi.

W odniesieniu do części eksperymentalnej pracy ma jedno pytanie natury ogólnej i dwa bardziej szczegółowe:

- jakie są możliwe mechanizmy ewolucyjne wpływające na zmienność ewolucyjną regionów *cis*-regulatorowych?

- czy do analizy porównawczej RNAseq wykorzystano jako kontrolę (WT) odmianę Monolit? Jeśli tak, to czy wszystkie substytucje nukleotydowe zidentyfikowane u mutanta *bna08hb6* (5 missense i 1 nonsense) były wynikiem mutagenezy TILLING? Czy różnice ekspresji pomiędzy mutantem i WT wynikały wyłącznie z wyłączenia genu *BnaC08HB6*?

- jaka jakość preparatów RNA (mierzona wartością RIN) jest uważana za optymalną dla RNAseq?

Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia Pani mgr Natalii Żyły, będące wynikiem badań opisanych w rozprawie doktorskiej uważam: (1) wskazanie na subfunkcjonalizację homologów genu *BnaHB6* u rzepaku; (2) udowodnienie, że ich promotory indukują ekspresję w warunkach stresu deficytu wody i w reakcji na ABA; oraz, (3) że geny te regulują ekspresję genów *BnaABF4* i *BnaDREB2A*, zaangażowanych w odpowiedź na niedobór wody. Prace eksperymentalne były oparte o poprawne założenia teoretyczne, miały złożony charakter i wymagały znaczącego zaangażowania Doktorantki. Hipotezy badawcze zostały właściwie zweryfikowane w oparciu o precyzyjnie zaplanowane doświadczenia, wyciągnięto poprawne wnioski, a opisane mechanizmy wniosły nową wiedzę w zakresie reakcji roślin rzepaku na stres niedoboru wody kontrolowany aktywnością czynników transkrypcyjnych BnaHB6.

Stwierdzam, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, tekst jednolity: Dz.U. z 2021 r., poz. 478)**. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Natalii Żyły oraz umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuję zatem o dopuszczenie Pani mgr Natalii Żyły do dalszych etapów procedury doktoranckiej.**

Kraków, 16 października 2025 prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus