



INSTITUTE OF PLANT GENETICS POLISH ACADEMY OF SCIENCES

Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Tel.: +48 616550200 or 616550255 E-mail: rmal@igr.poznan.pl
[www.igr.poznan.pl] VAT: PL 7811621455 REGON: 000326204 BDO: 000017736

Poznań 03_11_2023

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kościelniak pt. Czynniki regulujące wzrost korzeni dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) w warunkach naturalnych i kontenerach szkółkarskich

Ocena ogólna rozprawy doktorskiej

Praca dotyczy zmian na poziomie transkrypcji towarzyszących wykształceniu się różnych typów morfologicznych systemów korzeniowych u dębu szypułkowego pod wpływem warunków uprawy. Autorka zainteresowała się niepożądanym zjawiskiem występującym w kontenerowych szkółkach zajmujących się produkcją materiału wykorzystywanego do nasadzeń leśnych. Otóż, w warunkach uprawy w niewielkich kontenerach, gdy korzeń palowy napotka przeszkodę do dalszego rozwoju, lub nastąpi jego mechaniczne uszkodzenie, dochodzi do zahamowania jego wzrostu i stymulacji rozbudowy korzeni bocznych. Prowadzi to do powstania systemu korzeniowego, który nie jest przystosowany do pobierania wody oraz substancji odżywczych z głębszych warstw gleby. To z kolei uzależnia tak zmienione rośliny od zewnętrznych warunków pogodowych i naraża je na stres suszy, osłabienie wzrostu, a co za tym idzie również atak patogenów. Zjawisko jest zasadniczo znane w produkcji szkółkarskiej ale w niniejszej pracy autorka postanowiła uzyskać sygnatury transkrypcyjne, dzięki którym możliwe byłoby głębsze zrozumienie dynamiki wzrostu korzenia. W pracy badano również wariant wzrostu korzeni po przesadzeniu z kontenerów do gleby. Jest to ważne dla zrozumienia plastyczności rozwojowej korzeni i ich zdolności do ponownego uruchomienia wzrostu korzeni palowych, a co za tym idzie możliwości przystosowania się po przesadzeniu do ziemi.

Przedstawiona dysertacja obejmuje 4 prace naukowe, z których 2 już ukazały się drukiem a dwie pozostałe są jeszcze nieopublikowane. Pierwsza publikacja (Kościelniak i wsp. *Frontiers in Plant Sciences* 2021) to praca przeglądowa dotycząca zagadnienia rozwoju korzeni palowych u różnych gatunków drzew liściastych. Druga praca dotyczy bazy danych

transkryptów stworzonej w oparciu o wyniki sekwencjonowania uzyskane w eksperymentach będących integralną częścią tej dysertacji (Kościelniak i wsp., 2022 Database). W trzeciej pracy podjęto się próby przypisania pewnych zmienionych wzorców ekspresji genów, które uznano za typowe dla rodzaju korzeni oraz ich typu wzrostu w obrębie systemu korzeniowego dębu szypułkowego. Praca czwarta jest nieco pogłębioną analizą, w której skupiono się na zagadnieniu hormonalnej regulacji wzrostu korzeni i porównano wyniki analiz transkryptomicznych z profilami zawartości regulatorów wzrostu w badanych rejonach i typach korzeni dębów pochodzących z uprawy bezpośrednio w gruncie, uprawy kontenerowej oraz po przesadzeniu z kontenera do gruntu.

Układ dysertacji jest charakterystyczny dla tego typu rozpraw. Jest jednak jeden aspekt, o którego uzupełnienie będę prosił. Niestety w pracy nie przedstawiono wniosków jakie wynikają z uzyskanych wyników, na stronie nr 28 zamieszczono jedynie podsumowanie.

Dysertacja zawiera, wymagane w przypadku prac będących zbiorem tematycznie powiązanych artykułów, oświadczenia współautorów dotyczące ich indywidualnego wkładu w poszczególne publikacje. Z oświadczeń jasno wynika, że autorka niniejszej dysertacji pełniła we wszystkich pracach rolę wiodącą. Praca została przygotowana starannie, co pozwala na ocenę merytoryczną ogólnej wiedzy kandydatki, umiejętności samodzielnego prowadzenia prac oraz rozwiązywania problemów naukowych.

Ocena merytoryczna prac eksperymentalnych, przedstawienia wyników i ich dyskusji

Zagadnienie, którego dotyczy praca ma bezpośredni związek z produkcją szkółkarską. Po bliższym zapoznaniu się z układem eksperymentalnym i sposobem dokumentacji przebiegu badań mogę stwierdzić, że tak przeprowadzone eksperymenty umożliwiają wytłumaczenie zjawisk obserwowanych w szkółkach na poziomie, który pozwoli na dopasowanie lub skorygowanie w przyszłości metod uprawy. Uzyskane dane mogą również posłużyć w przyszłości do badań funkcjonalnych, których celem będzie dalsze wyjaśnienie biologicznych podstaw zachodzących procesów.

Przystępując do prac eksperymentalnych autorka dobrze się przygotowała czego wyrazem jest znajomość aktualnych danych literaturowych dotyczących tworzenia się korzeni palowych oraz ich wzrostu u drzew liściastych. Praca przeglądowa, w której jest wiodącym autorem jest napisana w sposób przejrzysty i jasny. W moim mniemaniu praca ta mogłaby

być jeszcze bardziej kompletna gdyby ujęto w niej również kwestie anatomiczne wraz z przedstawieniem odpowiednich obrazów mikroskopowych dla różnych gatunków drzew liściastych. To nie zmienia mojej pozytywnej oceny pracy, choć wydaje mi się że tego typu zabieg ułatwiłby zrozumienie opisywanych molekularnych mechanizmów regulacji i skorelowanie ich z charakterystycznymi wzorcami, które odbiegają jednak nieco od modeli takich jak *Arabidopsis thaliana*.

Jeśli chodzi o kwestie metodyki oraz zaprojektowania eksperymentu moje zastrzeżenia zasadniczo dotyczą jedynie aspektów związanych z dokumentacją pobranych prób. Doceniam fakt, że w celu umożliwienia sobie inspekcji wzrostu systemów korzeniowych, wykorzystano rhizotrony, dzięki którym poprzez przezroczystą płytę można było obserwować rozwój i wzrost korzeni. Autorka przy pobieraniu prób skupiła się na rejonie stożka wzrostu korzenia (czapeczka, merystem oraz rejon różnicowania się) oraz osobno na znajdującej się powyżej strefie elongacji. To w oczywisty sposób umożliwia skorelowanie uzyskanych wyników z balansem pomiędzy proliferacją komórek a ich dalszym wzrostem. W żadnej z prac niestety nie znalazłem jednak jak typowano poszczególne rejony (zwykle dokonuje się tego oceniając aktywności podziałowe).

W artykule nr 3 (rycina 15) przedstawiono porównanie anatomii typowych oraz pogrubionych/rozrośniętych stożków wzrostu korzeni palowych *Q. robur* ale jakość przekrojów jest niska i nie pozwala na odróżnienie poszczególnych warstw komórkowych.

Niestety we wszystkich pracach wchodzących w skład niniejszej dysertacji nie dostrzegłem również tego czy przeprowadzono obserwacje dotyczące inicjacji zakładania się korzeni bocznych. Z punktu widzenia biologii rozwoju zakładanie się primordiów korzeni bocznych jest zupełnie innym procesem niż aktywacja wzrostu odróżnicowanych primordiów przejawiająca się na poziomie makroskopowym. Zakładanie się primordiów korzeni bocznych może być obserwowane na poziomie transkrypcji jako lokalna aktywacja specyficznych dla tego procesu genów, która oczywiście odpowiada nadrzędnym czynnikom regulującym to w sposób systemiczny (np. auksyny). W pracy brak dokumentacji kwestii związanych z inicjacją tworzenia się korzeni bocznych, co w moim mniemaniu znacznie ogranicza możliwość interpretacji danych (np. dotyczących ekspresji genów charakterystycznych dla inicjacji korzeni bocznych czy też zagadnień związanych z transportem, biosyntezą i przekazem sygnału auksyny). Pomimo wyżej wspomnianego problemu zasadniczo uważam, że eksperymenty przeprowadzono poprawnie a moja uwaga dotyczy jedynie aspektu, który być

może wykracza nieco poza cel niniejszej pracy i kieruje nas w zakres badań podstawowych. Generalnie uważam jednak, że zobrazowanie pobrania poszczególnych prób na poziomie anatomicznym ułatwiłoby zrozumienie badanego zjawiska i zwiększyłyby zakres możliwości interpretacji wyników transkryptomicznych oraz pomiarów regulatorów wzrostu. Proszę o ustosunkowanie się do tej uwagi.

Metodyka wykorzystana w pracach eksperymentalnych wskazuje na to, że w trakcie studiów doktoranckich Pani mgr Paulina Kościelniak uzyskała doświadczenie i płynność w posługiwaniu się narzędziami biologii molekularnej. Prace transkryptomiczne na modelu jakim jest dąb szypułkowy są dość trudne; zarówno prowadzenie uprawy w sposób wyrównany, jak i późniejsza izolacja RNA jakości pozwalającej na syntezę cDNA, stworzenie bibliotek i dalsze sekwencjonowanie. Kolejnym aspektem, być może jeszcze trudniejszym, jest kwestia odpowiedniego uporządkowania uzyskanych danych i uzyskania poprawnych ramek odczytu (ang. *assembly*) oraz dalszego opisu (ang. *annotation*) na podstawie dostępnych źródeł genomowych dla tego gatunku, lub homologii do innych modeli. Ze względu na znaczenie gospodarcze i ekologiczne dębów genom dla tego gatunku jest poznany (Plomion i wsp., Nature 2018). [<https://www.oakgenome.fr/>]. Zasadniczo prowadzono również już wcześniej prace dotyczące transkryptomiki dla tego gatunku i na ich podstawie stworzono bazę danych OakContigDF159.1 (Tarkka i wsp. New Phytologists 2013). Prace te dotyczą jednak głównie kwestii oddziaływań z pożytecznymi mikroorganizmami, czy też odpowiedzi na warunki stresowe lub uprawę w różnych warunkach kultur in vitro (włączając systemy regeneracji). Prace autorki niniejszej dysertacji mają inny cel w związku z czym układ eksperymentalny jest unikatowy. Oczywiście w wielu pracach autorzy posiłkują się bazą DF159 przy analizie danych transkryptomicznych. Autorka ocenianej tu rozprawy doktorskiej postanowiła jednak dla swojego eksperymentu stworzyć indywidualną anotację, co również skutkuje stworzeniem bazy danych OakRootRNADB i tego dotyczy druga publikacja wchodząca w skład niniejszej dysertacji. Choć nie jestem ekspertem w zakresie bioinformatyki i obróbki danych transkryptomicznych to uważam ten aspekt pracy za bardzo trafny ponieważ zwyczajnie ułatwia to naukowcom korzystanie z uzyskanych danych. Będę jednak wdzięczny jeśli doktorantka odniesie się do tego aspektu i przedstawi w przystępny dla biologa sposób jakie są dodatkowe korzyści z tego działania.

Układ prac nr 3 i 4 jest dość charakterystyczny dla publikacji opisujących wyniki transkryptomyczne. Przedstawiono przyporządkowanie różnicujących transkryptów do funkcji biologicznej, czy też komponentów subcelularnych. Wykorzystano również bazę KEGG. Oczywiście kwestie przypisywania konkretnej funkcji poszczególnym zmianom ekspresji należy traktować z pewnym dystansem do momentu przeprowadzenia bardziej funkcjonalnych analiz. Osobiście trochę żałuję, że w pracy nie wykorzystano narzędzi pozwalających na przewidywanie sieci oddziaływań w oparciu o nakładające się profile ekspresji. To oczywiście jest także predykcja ale czasem pozwala wychwycić najbardziej istotne wątki, które należy zbadać funkcjonalnie. Rozumiem, że dla takiego modelu jak dąb szypułkowy jest to dość żmudne zadanie jednakże analiza transkryptomiczna to raczej odnoszenie się do pewnych wzorców, dlatego to uważam, że to by było bardzo pomocne.

W artykule nr 4 zawarto również analizę regulatorów wzrostu i skorelowano jej wyniki z transkryptomiką. Na podstawie tego podjęto się interpretacji tego w jaki sposób dąb szypułkowy odpowiada zmianą architektury korzenia na warunki uprawy, a przede wszystkim to w jaki sposób to co dzieje się z korzeniem palowym przekłada się na zmianę architektury systemu korzeniowego. To bardzo dobry zabieg chociaż osobiście uważam, że również dobrze by było skupić się na kwestiach związanych z transkrypcją genów odpowiedzialnych za transport węglowodanów lub przekierowanie źródła azotu i przeprowadzenie analiz biochemicznych w tym kierunku. Wyżej wspomniane przeze mnie komponenty niejako modulują odpowiedź wzrostową korzeni (kwestie związane z aktywacją wzrostu bądź jego supresją w warunkach niekorzystnych). Mam w związku z tym pytanie; czy w danych transkryptomicznych zaobserwowano jakieś istotne zmiany dla tych aspektów?

Jeśli chodzi o same regulatory wzrostu to mam również pytanie z jakich dokładnie prób prowadzono izolację? Uzyskane dane na pewno zwiększają nasze rozumienie ale w przypadku hormonów roślinnych konkretne formy mają swoje miejsce syntezy, sposób transportu etc. Czy to zostało uwzględnione przy interpretacji wyników? Tu mam również pytanie w jaki sposób typ systemu uprawy wpływał na część nadziemną i czy to jest gdzieś opisane na poziomie fizjologicznym lub choćby pomiarów wzrostu?

Kolejnym aspektem pracy któremu chcę poświęcić nieco miejsca w niniejszej recenzji jest przedstawione podsumowanie wyników. Pomimo tego, że z większością stwierdzeń zamieszczonych w punktach na stronie 28 się zgadzam to są również takie, co do których

mam wątpliwości czy są w wystarczający sposób poparte danymi eksperymentalnymi. Mianowicie:

4) Opisanie szlaku sygnałowego MAPK jako ścieżki odpowiedzialnej za inicjację tworzenia korzeni bocznych ...

Szlak sygnałowy MAPK rozpoczyna się zwykle od percepcji bodźca a to prowadzi np. do fosforylacji domeny kinazy receptora lub innych przemian na poziomie oddziaływań białkowych. Uruchomienie kaskady fosforylacji MAPKKK, potem MAPKK, a później MAPK i ewentualnie aktywacja kolejnych czynników byłoby tu właściwym scenariuszem prowadzącym do reakcji na poziomie komórkowym. Autorka nie opisała zaangażowania konkretnego szlaku sygnałowego ponieważ nie prowadzono takich prac (badanie fosforylacji, powiązanie bodźca z efektem etc.)

5) Wykazanie aktywności LRP1 jako potencjalnego czynnika regulującego wydłużanie korzeni...

Proszę zaproponować potencjalny mechanizm w oparciu o uzyskane dane oraz istniejący stan wiedzy. Czy możemy wykluczyć to, że wzrost ekspresji był spowodowany różnicowaniem się większej ilości primordiów korzeni bocznych? Oczywiście pod warunkiem, że zakładanie się korzeni bocznych obserwowano. Osobiście byłbym ostrożny w zbyt daleko idących wnioskach formowanych na podstawie korelacji zwiększonej ekspresji pojedynczego czynnika z długością korzeni.

7) Określenie genu ERF15 kodującego czynnik transkrypcyjny jako odpowiedzialnego za ponowienie wzrostu korzenia palowego...

W przypadku danych transkryptomicznych możemy mówić jedynie o tym, że danemu fenotypowi towarzyszył taki lub inny profil transkrypcji. To jeszcze nie jest dowód na to, że ten konkretny czynnik odpowiada za tę regulację.

10) Przedstawienie po raz pierwszy roli hormonów roślinnych w regulacji wzrostu korzeni dębu...

Tu również, pomimo pomiarów poziomów regulacji regulatorów wzrostu, nie możemy dokładnie napisać jaka jest rola poszczególnych związków. Nie prowadzono badań z inhibitorami biosyntezy, transportu, przekazu sygnału, czy też substancjami współzawodniczącymi o miejsce wiązania w receptorach. Zagadnienie jest bardzo złożone.

Ostatnia uwaga dotycząca pracy dotyczy braku wniosków. Jako, że umiejętność ich formułowania jest jedną z najważniejszych cech naukowca proszę o przedstawienie jednego lub kilku wniosków. Mogą one dotyczyć różnic pomiędzy metodami uprawy, tego na ile konkretne reakcje rośliny odzwierciedlane są na poziomie transkryptu etc. Proszę również odnieść się we wnioskach do celów badawczych (strona 15).

Wszystkie pytania zamieszczone w niniejszej recenzji wynikają z mojej roli jako recenzenta i chęci stymulacji dyskusji naukowej. Wyniki prac przedstawionych w niniejszej dysertacji oceniam jednoznacznie pozytywnie i uważam, że zgromadzona wiedza stanowi dobry punkt wyjścia do badań funkcjonalnych. Te oczywiście wymagają wiele wysiłku ze względu na charakter obiektu eksperymentalnego i dostępność poszczególnych narzędzi. Tak naprawdę w przypadku roślin drzewiastych na poziomie globalnym nie mamy pełnego obrazu mechanizmów regulujących architekturę korzeni i nie potrafimy precyzyjnie określić dlaczego w poszczególnych rejonach następuje aktywacja wzrostu korzeni bocznych. Choć prace transkryptomyczne są tylko jednym z elementów układanki to dobrze wykonane mają ogromną wartość dla budowania kolejnych etapów, które mogą doprowadzić nas do pełnego zrozumienia zjawiska. Wyniki uzyskane przez Panią mgr Paulinę Kościelniak niewątpliwie są przykładem solidnej pracy i mogą być punktem wyjścia dla dalszego zgłębiania zagadnienia. Kandydatka wykazała się wysokim poziomem wiedzy w zakresie nauk biologicznych Praca stanowi oryginalne podejście badawcze i wprowadza problematykę metod szkółkarskich w uprawie dębu szypułkowego na nowy poziom.

Podsumowanie oceny

Autorka dysertacji przedstawiła osiągnięcie naukowe, które przybliżyło nasze rozumienie regulacji rozwoju systemów korzeniowych dębu szypułkowego w odpowiedzi na zastosowany system uprawy. Autorka pracy wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz bardzo dobrym rozumieniem tematyki badawczej a jakość prezentowanych danych świadczy o jej wysokich umiejętnościach (zwłaszcza z zakresu transkryptomiki i analizy danych transkryptomicznych). Niniejsza rozprawa doktorska spełnia kryteria zawarte w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dziennik ustaw 2023, poz. 742 z późn. zm.). Uwzględniając powyższy fakt oraz

pozostałe aspekty, które poruszono w niniejszej recenzji wnoszę o dopuszczenie niniejszej dysertacji do publicznej obrony oraz nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych, dyscyplinie nauk biologicznych Pani mgr Paulinie Kościelniak.

Z poważaniem

dr hab. Robert Malinowski prof. IGR PAN


Kierownik Zakładu Zintegrowanej Biologii Roślin

Instytut Genetyki Roślin PAN



Signed by /
Podpisano przez:

Robert
Malinowski

Date / Data:
2023-11-10 08:34