



dr hab. Katarzyna Sokołowska
e-mail: katarzyna.sokolowska@uwr.edu.pl

Wrocław, 31.10.2023 r.

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

Mechanizmy regulujące procesy wzrostu i rozwoju systemu korzeniowego roślin drzewiastych stanowią skomplikowany oraz wciąż słabo poznany układ wzajemnych zależności czynników genetycznych, hormonalnych i środowiskowych, kluczowy dla zrozumienia funkcjonowania roślin drzewiastych, a także ich odpowiedzi na zachodzące zmiany klimatyczne.

Głównym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kościelniak jest poznanie czynników molekularnych regulujących wzrost korzeni dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.), zarówno korzenia palowego jak i korzeni bocznych, w sadzonkach rosnących w warunkach naturalnych oraz w kontenerach szkółkarskich, a także po przesadzeniu roślin. Rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pana dr hab. Marcina Zadwornego (promotor) oraz Pani dr Pauliny Glazińskiej (promotor pomocniczy) w Zakładzie Ekologii Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk. Badania prezentowane w recenzowanej rozprawie wykonano w ramach projektu zatytułowanego „Endogenne czynniki regulujące rozwój korzeni palowych dębów – konsekwencje dla uprawy kontenerowej i polowej” (nr 2018/29/B/NZ9/00272) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (OPUS, kierownik: dr hab. Marcin Zadworny).

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kościelniak tworzy zbiór czterech połączonych tematycznie anglojęzycznych prac, które stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Cykl ten obejmuje dwa artykuły (przeładowy i eksperymentalny)

opublikowane w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej o sumarycznym współczynniku wpływu 12,427 oraz dwie prace eksperymentalne przygotowane w formie manuskryptów gotowych do submisji. Pierwszy artykuł z cyklu ma charakter przeglądowy i został opublikowany w 2021 r. w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*. Natomiast drugi artykuł to oryginalna praca eksperymentalna opublikowana w 2022 r. w *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*. Oprócz wspomnianego cyklu prac rozprawa doktorska zawiera przygotowane w języku polskim krótkie wprowadzenie, opis celów i zadań badawczych, szczegółowe omówienie uzyskanych wyników z ich podsumowaniem oraz spisem literatury, a także oświadczenia udziału Doktorantki i współautorów. Cała rozprawa doktorska liczy ponad 330 stron.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej stanowią cykl skoncentrowany na poznaniu molekularnych mechanizmów zaangażowanych we wzrost korzeni dębu szypułkowego. Rozprawa zawiera liczne i interesujące dane z szeroko zakrojonych analiz transkryptomicznych oraz analiz poziomu wybranych hormonów roślinnych w korzeniach palowych (o różnych typach morfologicznych) oraz w korzeniach bocznych. Materiał do analiz był pobrany z sadzonek rosnących w odmiennych systemach uprawy: ryzotronach i kontenerach szkółkarskich. Uzyskane wyniki zostały wnikliwie przeanalizowane oraz dogłębnie przedyskutowane w odniesieniu do literatury przedmiotu świadcząc o dojrzałości naukowej Doktorantki. Warto również podkreślić, że wszystkie cztery prace tworzące rozprawę doktorską Pani mgr Pauliny Kościelniak zawierają w sumie prawie 40 tablic z wykresami i schematami oraz przejrzyste zestawienia uzyskanych wyników w formie tabel, szczególnie obszernych w materiałach dodatkowych (11 tablic na ponad 150 stronach).

We wszystkich czterech pracach wchodzących w skład rozprawy Pani mgr Paulina Kościelniak jest zarówno pierwszym autorem, jak i autorem korespondencyjnym. W artykule przeglądowym Doktorantka brała udział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu wszystkich rozdziałów, a w pozostałych trzech pracach eksperymentalnych odpowiadała dodatkowo za wysiew, uprawę i zbiór materiału roślinnego, optymalizację protokołów, przygotowanie materiału do sekwencjonowania wraz z walidacją uzyskanych wyników, przeprowadzenie analiz bioinformatycznych i statystycznych. Doktorantka uczestniczyła też w przygotowaniu manuskryptów (m.in. opracowaniu rozdziałów, schematów, figur, tabel) oraz we wszystkich etapach procesu publikacyjnego. Jestem przekonana o wiodącym udziale Doktorantki w ocenianym cyklu prac wchodzących w skład recenzowanej rozprawy. Warto podkreślić, że Pani mgr

Paulina Kościelniak nie tylko spełnia wymogi stawiane Doktorantom przedstawiającym rozprawy doktorskie oparte o zbiór publikacji, ale znacząco je przewyższa.

Pierwszy artykuł wchodzący do cyklu prac podsumowuje aktualną wiedzę na temat różnorodnych czynników endo- i egzogennych regulujących rozwój i wzrost korzeni pierwotnych. Doktorantka opierała się głównie na informacjach uzyskanych podczas badań rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, jednakże w miarę możliwości i dostępności danych literaturowych, podkreślała odmienną specyfikę systemu korzeniowego roślin wieloletnich oraz specyfikę mechanizmów regulujących wzrost i rozwój korzeni u organizmów drzewiastych.

Drugi artykuł wchodzący w skład rozprawy doktorskiej prezentuje nowo utworzoną bazę danych OakRootRNADB, w której zamieszczono wyniki sekwencjonowania transkryptomów (RNA-seq) korzeni palowych i bocznych dębu szypułkowego. Przygotowana baza zawiera wyniki w przyjaznej dla użytkowników postaci konkretnych sekwencji transkryptów kodujących białka, a także lncRNA (ang. *long non-coding RNA*) oraz miRNA, wskazując również dodatkowe informacje dotyczące prawdopodobnej roli kodowanego przez sekwencję białka i jego przypuszczalnej lokalizacji komórkowej. Dzięki starannemu i kompleksowemu zaplanowaniu uprawy sadzonek dębu w różnych układach eksperymentalnych oraz sposobu pobierania materiału roślinnego do analiz NGS, w trakcie którego słusznie brano pod uwagę morfologię korzeni palowych (ich długość, grubość, żywotność), a także strefę korzenia palowego, z której uzyskiwano wierzchołki korzeni bocznych, baza danych OakRootRNADB stanowi niezwykle cenne narzędzie badawcze. Umożliwia prowadzenie szczegółowych i kompleksowych analiz porównawczych poziomów ekspresji różnych genów potencjalnie regulujących procesy wzrostu i rozwoju korzeni dębu, czego najlepszym potwierdzeniem są kolejne prace eksperymentalne wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Kościelniak. Co ważne, przygotowana baza pozwala na identyfikację czynników wpływających na zahamowanie a następnie na wznowienie wzrostu korzenia, a także zawiera informacje o licznych cząsteczkach miRNA zidentyfikowanych w korzeniach dębu. Niektóre z tych cząsteczek wydają się być specyficzne dla roślin drzewiastych, co z pewnością będzie wykorzystywane w przyszłych badaniach prowadzonych przez różne grupy.

W związku z tym, że klasyfikacja pobieranych próbek roślinnych wykorzystywanych do sekwencjonowania i następnie do przygotowania bazy jest kluczowa oraz ze względu na to, że w późniejszych analizach rozróżniane są strefy merystematyczna i elongacyjna korzenia, chciałabym uzyskać trochę więcej informacji na temat wykorzystywanego

materiału roślinnego. Czy pobierane próbki różniły się długością pomiędzy różnymi typami morfologicznymi korzenia palowego (krótki, średni, długi), a może zawsze uzyskiwano z sadzonek fragmenty o tej samej długości? W metodyce uprawy roślin i sposobu pobierania próbek do analiz przedstawionej w trzeciej pracy wchodzącej w skład rozprawy podane jest, iż do analiz wykorzystywano wierzchołki korzeni palowych i bocznych zawierających strefę merystematyczną. Natomiast w czwartej pracy z cyklu rozróżniane są w analizach dwie strefy – merystematyczna i elongacyjna. W trzeciej pracy (Tabl. 1) zaprezentowano zdjęcie sadzonki dębu rosnącej w ryzotronie, na której zaznaczono 10 różnych odcinków korzenia. Które z tych odcinków identyfikowano jako wierzchołki korzenia ze strefą merystematyczną? Na jakiej podstawie rozróżniono strefę elongacyjną korzenia? Czy próbki materiału pobierane z korzeni palowych o różnej morfologii – krótkich, średnich i długich, różniły się między sobą proporcją udziału stref merystematycznej i elongacyjnej? Rozróżnienie w dalszych analizach porównawczych obu stref jest jak najbardziej zasadne, jednakże, w moim odczuciu, opis pobierania materiału oraz identyfikacji poszczególnych stref korzenia jest niewystarczający i powinien zostać uszczegółowiony.

Trzecia i czwarta praca z cyklu, obie przygotowane w formie manuskryptów, stanowią szczegółowe analizy wzorów ekspresji genów w korzeniach palowych i bocznych, a także ich zmian w trakcie wydłużania korzenia w zależności od jego morfologii oraz sposobu uprawy (system ryzotronowy, kontenerowy oraz rośliny po przesadzeniu z kontenerów do ryzotronów). Wzory ekspresji genów pomiędzy różnymi wariantami porównywano wykorzystując analizę DEGs (ang. *Differentially Expressed Genes*), przeprowadzono także analizę funkcjonalną w oparciu o kategorie GO (ang. *Gene Ontology*) oraz o bazę danych KEGG (ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). W czwartej pracy dodatkowo przeanalizowano poziomy głównych hormonów roślinnych we wszystkich typach uprawy roślin. Uzyskane wyniki przedstawione w trzeciej i czwartej pracy z cyklu pozwalają lepiej zrozumieć, jak czynniki endogenne mogą promować lub hamować inicjację i dalszy wzrost korzeni palowych i bocznych, a także jak ograniczone miejsce w uprawie kontenerowej, czyli czynnik egzogenny, może wpływać na wzrost korzenia oraz oddziaływać na poziom molekularnej regulacji tego procesu. Uważam, że prezentowane dane są niezwykle cenne pod kątem badań podstawowych, ponieważ poszerzają naszą wiedzę na temat molekularnej regulacji procesów rozwojowych u roślin wieloletnich, u których mechanizmy są często bardziej złożone niż w przypadku roślin zielnych. Jestem pod wrażeniem nakładu pracy włożonego przez Doktorantkę w przeprowadzenie tak

wymagających i czasochłonnych eksperymentów, szczegółowe opracowanie wyników i ich wnikliwą oraz wielowątkową dyskusję. Doktorantka wskazała nowe, potencjalne czynniki transkrypcyjne regulujące procesy inicjacji i wzrostu korzeni bocznych, a także wysnuła ciekawy wniosek, iż regulacja metabolizmu auksyn w korzeniach dębu opiera się raczej na kontroli poziomu syntezy i degradacji koniugatów auksynowych. Moją uwagę zwróciła również ciekawa sugestia o potencjalnej roli wapnia w indukcji ekspresji genów odpowiedzialnych za promowanie wzrostu i wydłużania korzeni. Warto pokreślić także zidentyfikowanie grupy genów ulegających bardzo silnej ekspresji specyficznie w korzeniach bocznych, co świadczyć może o odmiennych mechanizmach regulujących procesy wzrostowe tych korzeni w porównaniu z systemem głównym

Rozprawa doktorska jest również doskonale przygotowana od strony edytorskiej i stylistycznej. Jako recenzent mam jednak kilka uwag, które odnoszą się szczególnie do prac przygotowanych w formie manuskryptu. Poniższe komentarze czy znalezione błędy, co chciałabym podkreślić, nie umniejszają wartości samej rozprawy. W trzeciej pracy nie zamieszczono tablic 11, 12 i 13, zabrakło także wytłumaczenia niektórych skrótów np. LRP (abstrakt), BR, PIN, GA (wstęp). W opisie wyników pojawiają się czasem literówki (np. skrót TNTR) czy nieścisłości (w analizach DEGs porównujących korzenie krótkie i długie takie same sekwencje zidentyfikowano w 27,5 % a nie w 44,5 %). Warto poprawić oznaczenia na niektórych schematach i wykresach – są one za małe i/lub nieczytelne (np. Fig 3, 4 w trzeciej pracy, Fig. 9 w pracy czwartej). Kolejność chronologiczna odsyłaczy do referencji (zarówno w polskim wprowadzeniu jak i w przygotowanych manuskryptach) nie zawsze jest zachowana. W czwartej pracy skróty stosowane na schematach i wykresach nie zostały wytłumaczone w podpisie pod konkretną tablicą. Dla ułatwienia lektury warto także wyjaśnić jeszcze raz oznaczenia skrótów w podpisach tabel zamieszczonych w materiałach dodatkowych. Przedstawione w czwartej pracy wyniki analiz funkcjonalnych mogłyby być nieco precyzyjniej opisane, szczególnie, że w dyskusji Autorka często się do nich odnosi. Czytając część wynikową rozprawy miałam duże wątpliwości czy wyniki analiz GO i KEGG odnoszą się do sadzonek uprawianych w ryzotronach w porównaniu do uprawy kontenerowej (Tablice 3 i 4). W opisie wyników prezentowanych na Tabl. 5 wkradła się także drobna nieścisłość – liczba DEG w korzeniach o średniej długości jest porównywalna do wyników uzyskanych dla korzeni krótkich.

Myślę też, że warto poprawić niektóre bardzo długie oraz podrzędnie złożone zdania we wstępach i dyskusjach trzeciej oraz czwartej pracy. Warto również rozważyć

skrócenie obu prac przygotowanych w formie manuskryptów, ze względu na coraz częstsze wymagania czasopism odnoszące się do maksymalnej liczby słów w wysyłanych do recenzji manuskryptach. Oprócz skrócenia wstępów i dyskusji sugerowałabym także zmianę sposobu przedstawienia wyników, tzn. prezentacji zbiorczych analiz funkcjonalnych przeprowadzonych w oparciu o kategorie GO i bazę danych KEGG. W obecnej formie w każdej z prac przygotowanych w formie manuskryptu Autorka dwukrotnie prezentuje wyniki z analiz funkcjonalnych, co sprawia wrażenie pewnej redundancji.

W trzeciej pracy z cyklu, w ostatniej części wyników, zamieszczono krótki opis anatomiczny korzeni palowych z uprawy ryzotronowej. Doktorantka wymieniła typy inicjałów wchodzących w skład merystemu wierzchołkowego korzenia, scharakteryzowała strukturę walca osiowego wskazując na obecność poszczególnych elementów pierwotnego systemu naczyniowego (rozumiem, że wspomniane pasma ksylemowe mają również charakter pierwotny?). Niestety, wspomniane typy komórek i tkanek korzenia nie są zaznaczone na zdjęciach przekrojów podłużnych i poprzecznych zamieszczonych na Tablicy nr 15. Bardziej szczegółowe opisanie załączonych zdjęć, poprzez wskazanie konkretnych typów komórek i tkanek, a także uzupełnienie tablicy o zdjęcia strefy merystematycznej wykonane pod większym powiększeniem (w celu identyfikacji wspomnianych w tekście typów inicjałów i komórek strefy QC), są w mojej ocenie niezbędne. Pozostawiam również pod rozwagę zmianę kolejności prezentowanych wyników i przeniesienie obserwacji anatomicznych na początek pracy oraz połączenie opisu struktury korzenia z bardziej szczegółowym wytłumaczeniem, z których regionów korzenia były pobierane próbki do analiz NGS.

W czwartej pracy z cyklu porównywano wzory ekspresji genów w różnych układach eksperymentalnych, także po przesadzeniu roślin z kontenerów szkółkarskich do ryzotronów. Oczywiście idealnie byłoby, gdyby materiał do analiz pochodził z roślin znajdujących się w tym samym wieku. Przypuszczam jednak, że ze względów technicznych nie było to możliwe. Należy jednak pamiętać, że zidentyfikowane różnice we wzorach ekspresji genów pomiędzy roślinami przesadzonymi a tymi, które rosły przez cały czas w ryzotronach, mogą wynikać nie tylko z warunków uprawy, ale także z różnic w wieku roślin (14 vs 8 miesięcy).

Podsumowując, badania prowadzone przez Panią mgr Paulinę Kościelniak, przedstawione w cyklu czterech prac tworzących recenzowaną rozprawę doktorską, dostarczyły niewątpliwie nowych dla nauki oraz niezmiernie ważnych i interesujących

danych odnośnie molekularnych mechanizmów regulujących wzrost i rozwój systemu korzeniowego roślin drzewiastych na przykładzie sadzonek dębu szypułkowego. Równocześnie chciałabym podkreślić, iż badania prowadzone przez Panią mgr Paulinę Kościelniak, pod opieką promotorów głównego i pomocniczego, charakteryzuje wysoki aspekt aplikacyjny. Wszystkie przesłanki pozwalające poprawić jakość materiału szkółkarskiego, takie jak np. wskazanie zależności pomiędzy średnicą korzenia a potencjałem wznowienia wzrostu po przesadzeniu, są kluczowe dla dobrej kondycji zbiorowisk leśnych, szczególnie w aspekcie postępujących zmian klimatu i częstszych epizodów suszy.

Stwierdzam, że przedstawiona do rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Kościelniak spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Dendrologii Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Kościelniak do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy i nowatorstwo wszystkich prac - zarówno już opublikowanych jak i przygotowanych w formie manuskryptu, stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Katarzyna Sołtowska