

Prof. dr hab. Jakub Sawicki

Katedra Botaniki i Ekologii Ewolucyjnej

Wydział Biologii i Biotechnologii

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Plac Łódzki 1

10-719 Olsztyn

email:jakub.sawicki@uwm.edu.pl

tel: (89) 523 34 94

RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR SERHII MYKHALIILYKA WYKONANEJ W INSTYTUCIE BIOLOGII,
BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA, WYDZIAŁU NAUK PRZYRODNICZYCH UNIWERSYTETU
ŚLĄSKIEGO W KATOWICACH POD KIERUNKIEM PROF. DR HAB. ROBERTA HASTEROKA ORAZ DR NATALII
BOROWSKIEJ-ZUCHOWSKIEJ, ZATYTUŁOWANEJ "EVOLUTION OF 35S rRNA GENE LOCI IN SELECTED
GENOTYPES OF ALLOTETRAPLOID MODEL GRASS *BRACHYPODIUM HYBRIDUM*"

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i
Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w
Katowicach, zgodnie z art. 190 ust. 2 z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2023 r., poz.
742 ze zm.).

Doktorat mgr Serhii Mykhaliilyka został przygotowany w formie jedno autorskiego manuskryptu, obejmującego 85 stron, nie licząc rysunków i ich opisów. Praca bada ewolucję genów 35s rRNA w wybranych genotypach allotetraploidalnej modelowej trawy *Brachypodium hybridum* w kontekście dominacji jąderkowej (ND) i i ich zróżnicowania. ND to zjawisko epigenetyczne, które prowadzi do jednorodzicielskiego wyciszenia genów 35S rRNA w mieszańcach i allotetraploidach. Manuskrypt skupia się na mechanizmach molekularnych stojących za doborem genów 35S rRNA do represji w tym gatunku, który jest cennym modelem ze względu na jego kompaktowy genom i niską zawartość sekwencji powtórzonych. Doktorant zastosował szeroki wachlarz technik molekularnych, w tym FISH, hybrydyzację Southern, RT-qPCR, sekwencjonowanie i analizy bioinformatyczną, aby zbadać dystrybucję, wzorce ekspresji i status metylacji homologów 35S rDNA w różnych genotypach. Wyniki sugerują, że ND w *B. hybridum* jest regulowane rozwojowo, specyficzne dla genotypu i niezależne od efektów matczynych. Praca znacząco poszerza naszą wiedzę w zakresie zrozumienia mechanizmów ND oraz wzajemnych zależności między ekspresją genów, epigenetyką i różnorodnością populacji.

Pracę rozpoczyna obszerny, 17-stronicowy wstęp, który wprowadza czytelnika w zagadnienia ewolucji genów rRNA i mechanizmu dominacji jąderkowej (ND) allotetraploidalnego gatunku trawy, *Brachypodium hybridum*. Wstęp rozpoczyna się od podkreślenia znaczenia rodziny Poaceae, która jest ważna zarówno ekologicznie, jak i ekonomicznie, zwłaszcza w rolnictwie. Rodzaj *Brachypodium* jest przedstawiony jako idealny model do badań nad genetyką traw ze względu na mały rozmiar genomu i reprezentatywny kariotyp traw. Następny podrozdział charakteryzuje geny rRNA, ich strukturę, funkcję i organizację. Następnie autor skupia się na poliploidii traw, powszechnym zjawisku ewolucyjnym, określającym posiadanie przez organizm niż dwóch zestawów chromosomów. Ta cecha jest szczególnie istotna dla badania interakcji genomowych w

gatunkach hybrydowych i allotetraploidalnych. Praca doktorska koncentruje się głównie na badaniu ND w *B. hybridum*. ND to unikalne zjawisko epigenetyczne, w którym w organizmie hybrydowym preferencyjnie ekspresjonowany jest jeden zestaw rodzicielskich genów rybosomalnego RNA (rRNA) nad drugim. Ta selektywna ekspresja genów jest kluczowa dla zrozumienia genetycznych i epigenetycznych mechanizmów wpływających na rozwój i ewolucję roślin. Wstęp podkreśla także wkład i znaczenie prowadzonych badań w rozwój biologii molekularnej i genetyki roślin, szczególnie w kontekście gatunków traw. Cele i testowane hipotezy przedstawiono w oddzielnym rozdziale 2. Autorzy wskazują 5 celów i sformułowali trzy hipotezy, które koncentrują się na badaniu strukturalnej i funkcjonalnej dynamiki genów 35S rRNA w *B. hybridum*, zwłaszcza w kontekście ND.

Rozdział 3 doktoratu, "Materiały i metody", szczegółowo opisuje metodyki użyte w badaniach. Zawiera informacje na temat pochodzenia i hodowli materiału roślinnego, analiz cytomolekularnych i molekularnych, oraz specyficznych technik takich jak FISH, hybrydyzacja Southern blot i RT-qPCR. Dodatkowo opisuje analizy bioinformatyczne i przygotowanie próbek DNA i RNA, dając kompleksowy obraz ram eksperymentalnych wykorzystanych do badania złożonej dynamiki dominacji jąderkowej i ekspresji genów. Materiał badawczy obejmuje trzy gatunki traw: *Brachypodium hybridum* (o liczbie chromosomów $2n = 30$ i składzie subgenomu DDSS), *B. distachyon* ($2n = 10$, genom DD) i *B. stacei* ($2n = 20$, genom SS). Nasiona badanych genotypów tych gatunków zostały pozyskane z różnych źródeł, co jest udokumentowane w Tabeli 2. Niektóre próbki zawierają nazwy krajów (tam, gdzie szczegółowe współrzędne nie były dostępne), jednak zalecałbym dodanie krajów pochodzenia również do pozostałych rekordów, co ułatwi czytelnikom analizę tych danych. Rozdział ten jest ogólnie dobrze napisany, jednak moim zdaniem brakuje niektórych ważnych informacji, a uzasadnienie wyboru niektórych metod nie jest jasne:

- a) Sekwencjonowanie DNA metodą SBS nie zawiera metody konstrukcji biblioteki, co jest ważne ze względu na niektóre analizy oparte są na pokryciu (coverage).
- b) Dlaczego autor wybrał region *trnL-F* do analizy kierunku zapylania, skoro jest on raczej mało informatywny (przynajmniej na podstawie przedstawionych wyników w formie drzewa)?

Rozdział 4 opisujący wyniki podzielone jest na sześć głównych podrozdziałów. Chromosomowa lokalizacja loci 35S i 5S rDNA została przeanalizowana w 50 genotypach przy użyciu fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH), ujawniając ogólne wzorce i znaczące różnice w intensywności sygnałów FISH. Doprowadziło to do klasyfikacji genotypów na różne grupy na podstawie tych intensywności sygnałów.

Linia matczyzna została określona poprzez analizę genu chloroplastowego *trnL-F* w 58 genotypach *B. hybridum*. Analiza ta wykazała, że pochodzenie cpDNA subgenomu S zostało odnalezione we wszystkich genotypach z "wysokim poziomem pewności". Spekulowałbym na temat tego stwierdzenia, ponieważ 90% testu Ultrafastbootstrap jest po prostu nieistotne (Minh et al. 2013). Ponownie rodzi się pytanie o słuszność wyboru markera cpDNA.

Przeprowadzone analizy nie wykazały korelacji pomiędzy matczynym pochodzeniem cpDNA a aktywacją genów 35S rRNA subgenomu S, co sugeruje, że kierunek zapylania nie wpływa na dominację jąderkową. Jednak, moim zdaniem, przedstawione wyniki nie popierają tego stwierdzenia, ze względu na brak statystycznego wsparcia grupowania haplotypów *trnL-F*. Wzorce ekspresji homeologów 35S rDNA oceniano za pomocą techniki RT-CAPS. Wyniki wskazały na silną dominację jąderkową w liściach, bez obecności pochodzącego z *B. stacei* ITS1 w żadnym z genotypów. Jednak w następnej generacji, dwa genotypy wykazały dowody zniesienia dominacji jąderkowej. Około połowa badanych genotypów wyrażała geny 35S rRNA subgenomu S w korzeniach, demonstrując przy tym

zmiennosc poziomow ekspresji. Kolejny etapem badan bylo okresleni poziomu metylacji rodzicielskich jednostek 35S rDNA w roznych genotypach. Tylko dwa genotypy wykazaly niemetylowane jednostki 35S rDNA subgenomu S, a status metylacji okazal sie korelowac z ekspresja genow. Korelacja ta zostala dalej potwierdzona przez dodatkowe analizy, ktore wykazaly brak niemetylowanego subgenomu S w niektorych genotypach, co odpowiadalo brakowi ekspresji genow. Doktorant przeanalizowal takze korelacje miedzy cechami fizjologicznymi genotypow a ekspresja genow rRNA subgenomu S. Analiza obejmowala genotypy ze wszystkich glownych stref wilgotnosci w Izraelu, a wyniki uzyskane sugeruja, ze pochodzenie nie wydaje sie wplywac na dominacje jaderkowa w *B. hybridum*. Ogolnie rzecz biorac, wnioski dostarczaja cennych informacji o strukturze i funkcjonalnej roli genow rRNA w *Brachypodium hybridum* oraz poszerzaja nasza wiedze na temat dominacji jaderkowej, ekspresji i metylacji tych regionow.

Podczas lektury tego rozdzialu nasuwa sie jedno glowne pytanie: skoro wiekszosc stosowanych metod opiera sie na PCR (w tym w metodzie SBS) lub reakcjach RT, czy metylacja moze wplywac na te reakcje? Ogolnie regiony silnie metylowane sa niedostatecznie reprezentowane w bibliotekach i sekwencjonowaniu na platformie Illumina, a niektore badania wskazuja na modyfikacje RNA (w tym metylacje) jako inhibitory syntezy cDNA.

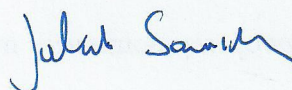
Glowna czesc pracy jest zwieńczona 9-stronicowa dyskusja odnoszaca sie do najnowszych odkryc w omawianym temacie. Eksploruje rozne scenariusze ewolucyjne, w tym utrzymanie, eliminacje lub konwersje jednostek rDNA od gatunkow przodkow. Rozdzial omawia regulacje rozwojowa dominacji nukleolarnej (ND), pokazujac jej zmiennosc w roznych tkankach i genotypach. Podkresla znacza role metylacji DNA w regulacji ND oraz brak efektu matczyngo na ND, przeciwstawiajac sie powszechnym zalozeniom w genetyce roslin.

Rozdział ten oferuje wszechstronne spojrzenie na genetyczne i epigenetyczne mechanizmy leżące u podstaw ND u *Brachypodium hybridum*. Podczas kompilacji pracy doktorskiej w formie manuskryptu trudno nie zauważyć drobnych błędów redakcyjnych i interpunkcyjnych, które są również obecne w recenzowanej pracy. Płynności i struktura rozdziału Wyniki mogłaby być lepiej zoptymalizowana ponieważ, w niektórych częściach jest trudna do śledzenia. Jednak te drobne kwestie nie wpływają na bardzo pozytywny odbiór recenzowanej pracy doktorskiej.

Podsumowanie

Całość przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej stanowi cenny wkład w poznanie biologii *Brachypodium hybridum*, zarówno w kontekście ewolucji genów rRNA, jak i w badaniu ich roli i funkcji. Zastosowane nowoczesne metody biologii molekularnej umożliwiają publikację wyników uzyskanych w tej pracy w renomowanych czasopismach. Recenzowana praca doktorska sprawia wrażenie rzetelnej pracy naukowej i spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą z 18 lipca 2018 roku (Artykuł 187) Dziennik Ustaw 2023, pozycja 742. W związku z powyższym uprzejmie proszę Wysoką Radę Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o przyjęcie pracy doktorskiej pana Serhii Mykhaliilyka oraz dopuszczenie doktoranta do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,



Jakub Sawicki

Olsztyn, 14.01.2024