



**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN**  
**PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY**  
**PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE**  
**NATIONAL RESEARCH INSTITUTE**

tel. centrala: +(4822)7334500, e-mail: [postbox@ihar.edu.pl](mailto:postbox@ihar.edu.pl)  
<http://www.ihar.edu.pl>, REGON 000079480, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008  
Nr konta: PEKAO I/O Błonie, 54 1240 2164 1111 0000 3561 7204

**Prof. dr hab. inż. Michał Kwiatek**  
**Zastępca Dyrektora ds. naukowych**  
e-mail: [m.kwiatek@ihar.edu.pl](mailto:m.kwiatek@ihar.edu.pl)  
tel. +(48 22) 725 45 03

Radzików, dnia 8 stycznia 2024 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Serhii'a Mykhailyk'a pt.:**  
**„Evolution of 35S rRNA gene loci in selected genotypes of allotetraploid model**  
**grass *Brachypodium hybridum*”**

Praca doktorska, której dotyczy niniejsza recenzja, została wykonana w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, a jej promotorem jest Pan prof. dr hab. Robert Hasterok a promotorem pomocniczym jest Pani dr Natalia Borowska-Zuchowska. Recenzję pracy wykonałem na podstawie uchwały Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska z dnia 17 listopada 2023 r., zawierającej informację o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter monografii naukowej, co dopuszcza artykuł 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – tekst jednolity: Dz. U. 2023 poz. 742.

Prezentowane badania zostały zrealizowane w ramach realizacji projektu badawczego OPUS pod tytułem „Cytogenomic analysis of key aspects of nuclear genome organisation in the polyploid model grass *Brachypodium hybridum* and its evolutionary ancestors”, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (numer projektu 2018/31/B/NZ3/01761), którego kierownikiem był prof. dr hab. Robert Hasterok, promotor niniejszej pracy doktorskiej. Ponadto, część wyników badań przedstawionych w pracy opublikowano w postaci następujących artykułów naukowych:

1. Borowska-Zuchowska, N., Robaszkiewicz, E., **Mykhailyk, S.**, Wartini, J., Pinski, A., Kovarik, A., and Hasterok, R. (2021). To be or not to be expressed: the first evidence of a nucleolar dominance tissue-specificity in *Brachypodium hybridum*. *Frontiers in Plant Science* 12:768347, doi: 10.3389/fpls.2021.768347;
2. Borowska-Zuchowska, N., **Mykhailyk, S.**, Robaszkiewicz, E., Matysiak, N., Mielanczyk, L., Wojnicz, R., Kovarik, A., and Hasterok, R. (2023). Switch them off or not: selective rRNA gene repression in grasses. *Trends in Plant Science* 28:661-672, doi: 10.1016/j.tplants.2023.01.002.

Praca doktorska Pana Serhii'a Mykhailyk'a zawiera 85 stron i jest uporządkowana według następującego podziału:

- Wprowadzenie,
- Cele pracy i hipotezy,

- Materiał i metody,
- Wyniki
- Dyskusja,
- Wnioski,
- Streszczenia w języku polskim i angielskim,
- Literatura.

Swoją recenzję chciałbym rozpocząć od oceny wprowadzenia do pracy, które rzeczowo i wyczerpująco przedstawia obecny stan wiedzy związany z tematem badań Doktoranta. Ta część pracy napisana jest w sposób szczegółowy, a zarazem przejrzysty. Chciałbym w tym miejscu wysoko ocenić dobór tematyki, która porusza kwestie ewolucyjne. Wprowadzenie zawiera kluczowe elementy dotyczące różnorodności biologicznej i znaczenia ekonomicznego rodziny traw oraz charakteryzuje rodzaj *Brachypodium*, geny rDNA, poliploidię w trawach, a także zjawisko dominacji jąderkowej (ND) w roślinach. Przejście między poszczególnymi sekcjami jest logiczne, a omówione tematy wprowadzają czytelnika w kontekst badanego zagadnienia wspomnianej dominacji jąderkowej. Wprowadzenie precyzyjnie przedstawia kluczowe aspekty tematu, przygotowując grunt pod dalsze rozważania. Dla przejrzystości brakuje jedynie spisu zastosowanych skrótów, które mogłyby być opisane w osobnym rozdziale pracy.

Szczególnie ważny dla tej pracy doktorskiej jest ostatni podrozdział Wprowadzenia, w którym Doktorant przedstawił przegląd literatury dotyczącej badań nad dominacją jąderkową u *Brachypodium hybridum*. Autor opisał lokalizację loci 35S rDNA w obu subgenomach *B. hybridum*, zwracając uwagę na ich aktywność transkrypcyjną oraz ich epigenetyczne modyfikacje. Wskazał, że ND może być zależna od genotypu, a struktura i aktywność genów 35S rDNA może ulegać zmianom w różnych tkankach i organach oraz na różnych etapach rozwoju rośliny. Przywołane przez Autora prace wskazują na istotną rolę zarówno czynników genetycznych, jak i epigenetycznych w regulacji ND. Autor przytoczył literaturę, w której wykazano, że w niektórych genotypach *B. hybridum*, loci 35S rDNA pochodzące od *B. stacei* charakteryzowały się redukcją rozmiarów i nie ulegały transkrypcji. Przytoczone we Wprowadzeniu wyniki badań epigenetycznych ujawniły wysoki poziom metylacji DNA w loci 35S rDNA pochodzących z *B. stacei*, ale ogólny poziom metylacji indukowany 5-azacytydyną nie prowadził do reaktywacji transkrypcji tych genów. To sugeruje, że obok metylacji DNA są jeszcze inne czynniki, które mogą brać udział w wyciszaniu tych genów. Doktorant omówił też badania dotyczące lokalizacji loci 35S rDNA w jądrach komórkowych. Wyniki wskazują na zróżnicowane położenie rDNA pochodzących od obu przodków (*B. stacei* i *B. distachyon*), co może wpływać na ich aktywność transkrypcyjną. Wskazał także na ewolucyjne zmiany w strukturze 35S rDNA, co wpływa na ich funkcję. Wstęp kończy się podkreśleniem roli *B. hybridum* jako obiecującego modelu do badań nad dominacją jąderkową, zwłaszcza wśród traw.

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawił cele badań oraz hipotezy badawcze. Badania Doktoranta z założenia miały na celu zrozumienie ewolucyjnych wzorców kształtowania się 35S rDNA w subgenomach *B. hybridum* oraz weryfikację czy mechanizmy molekularne odpowiedzialne za ustanowienie i utrzymanie dominacji jąderkowej są takie same w *B. hybridum*, jak w innych, zbadanych do tej pory allopoliploidach. Autor określił konkretne cele badawcze, takie jak: ustalenie liczby i lokalizacji chromosomowej loci 35S rDNA w różnych genotypach *B. hybridum* za pomocą techniki FISH oraz analiza pochodzenia 35S rDNA w wybranych genotypach przy użyciu

hybrydyzacji Southern i analizy bioinformatycznej odczytów surowych danych z platformy Illumina. Ponadto, analizował wzorce ekspresji genów 35S rRNA u *B. hybridum* przy użyciu technik RT-CAPS i RT-qPCR. Wreszcie, badał wpływ formy matecznej na wyciszanie loci 35S rDNA w genotypach *B. hybridum*, opierając się na analizie barcodingu genów chloroplastowych trnLF.

Hipotezy poddane weryfikacji obejmują stopniową eliminację 35S rDNA pochodzącego od *B. stacei* (genom S) u *B. hybridum* oraz brak efektu matczyngo w odniesieniu do wyciszania ekspresji 35S rDNA specyficznych dla subgenomu S. Bardzo wysoko oceniam sformułowanie hipotez badawczych. Mam natomiast swoje przemyślenia odnośnie do sposobu udowadniania pierwszej hipotezy, mówiącej, iż „jednostki 35S rDNA zlokalizowane w subgenomie S podlegają dominacji jąderkowej, co prowadzi do ich stopniowej eliminacji z genomu *B. hybridum*.” Do tego aspektu wrócę w dalszej części mojej recenzji.

Rozdział „Materiały i Metody” jest opisany w sposób wyczerpujący. Doktorant w sposób trafny dobrał zarówno materiał roślinny jak i metody badań. W mojej ocenie brakuje w tej pracy jedynie zastosowania metod cytogenetycznych opartych na immunobarwieniu, w celu identyfikacji regionów w chromosomach badanych roślin, gdzie dochodzi do metylacji histonów. Te analizy dostarczyłyby dodatkowych danych na temat dystrybucji zmian, warunkowanych epigenetycznie, w badanych roślinach i stanowiłyby dopełnienie przedstawionych analiz. Natomiast chcę podkreślić szeroki zakres oraz wysoki stopień zaawansowania zastosowanych przez Doktoranta metod i technik badawczych.

Wyniki badań zostały opisane w rozdziale czwartym. Na podkreślenie zasługuje logiczny układ następujących po sobie etapów badawczych, co wpływa na wysoką ocenę jakości niniejszej pracy doktorskiej. Autor na początku skoncentrował się na liczbie i lokalizacji loci 35S i 5S rDNA w różnych genotypach *B. hybridum*, a także na analizie homoeologów 35S rDNA, heterogeniczności 18S rDNA i ITS1, analizie haplotypów chloroplastów, wzorcach ekspresji homoeologów 35S rDNA oraz analizie metylacji DNA w loci 35S rDNA. Ponadto, podjął temat charakterystyki badanych genotypów *B. hybridum* w zależności od lokalizacji geograficznej miejsca ich pochodzenia w odniesieniu do średniorocznych opadów.

W toku analiz, Doktorant użył metody gCAPS w celu zweryfikowania obecności obu typów homologów 35S rDNA (Bd i Bs) w badanych 58 genotypach *B. hybridum*. Ze względu na różnice w sekwencji regionu ITS1 między homologami subgenomów D i S, tylko produkt PCR z podgenomu D ulegał przecięciu przez enzym *MluI*, co skutkowało uzyskaniem dwóch prążków na żelu agarozowym. W przeciwieństwie do tego, produkt PCR specyficzny dla *B. stacei* pozostał nieprzecięty z powodu braku rozpoznawalnego miejsca przez *MluI*. Interesująco przedstawiał się genotyp 12.23.2, w przypadku którego, w analizie gCAPS wykazano brak produktu charakterystycznego dla *B. stacei* (rysunek 25), co zostało potwierdzone przez analizy FISH, w których analogicznie wykazano brak sygnału FISH 25S rDNA w chromosomach subgenomu S. Brak produktu specyficznego dla subgenomu B (Bs) obserwowano również w genotypie ABR117. Niestety w pracy nie przedstawiono analizy cytogenetycznej (FISH) tego genotypu. Informacja o braku tej analizy nie znalazła się też w opisie analiz FISH (podrozdział 4.1), gdzie Autor wymienia genotypy, na których nie przeprowadzono analiz występowania sygnałów 25S rDNA. **W tym miejscu chciałbym zapytać jak wyjaśnić fakt braku prążku specyficznego dla Bs w genotypach 12.23.2 i ABR117? Jaki jest powód braku wyników analizy FISH z sondą 25S rDNA w odniesieniu do genotypu ABR 117?**

W kolejnym kroku Autor wykazał różnice w zawartości rDNA w genomach wybranych genotypów *B. hybridum*, należących do subgenomów D i S. Zostały one skwantyfikowane na podstawie wyników analizy Southern blot. Określił proporcję 35S rDNA podobnego do Bd (*B. distachyon*) lub Bs (*B. stacei*) w stosunku do całkowitego rDNA i przedstawił w ujęciu procentowym. Te wyniki były podstawą do kolejnego kroku, w którym udział homeologów 35S rDNA w różnych genotypach *B. hybridum* określono za pomocą hybrydyzacji Southerna i analiz bioinformatycznych, co wykazało stopniową eliminację loci 35S rDNA z subgenomu S w toku ewolucji. W kolejnym etapie badań wykazano, iż sekwencja ITS1 była bardziej jednorodna w *B. stacei* niż w pochodzącym z *B. stacei* ITS1 w *B. hybridum*. Sekwencja 18S rDNA jest bardziej jednorodna niż sekwencja ITS1 w obu badanych gatunkach. Kolejnym krokiem było określenie pochodzenia chloroplastowego DNA (cpDNA) wśród badanych genotypów *B. hybridum*. Powiązanie między pochodzeniem chloroplastów a obecnością ekspresji genów rRNA z podgenomu S dostarczyło dowodów na brak wpływu efektu matczynego na dominację jądrową. Ekspresję homeologów 35S rDNA monitorowano na różnych etapach ontogenezy *B. hybridum*, używając RT-qPCR z genomowo-specyficznymi starterami i RT-CAPS. Wykazano, że ND jest zjawiskiem genotypowym, pokoleniowym, tkankowym i indywidualnym. Dodatkowo ustalono, że ND występuje niezależnie od kierunku krzyżówki. Ciekawym i na pewno ekscytującym dla badacza zajmującego się genomiką ewolucyjną jest hipoteza możliwej korelacji pomiędzy miejscem zbioru w odniesieniu do poziomu opadów (a w zasadzie braku opadów) w tej lokalizacji geograficznej a ekspresją genów rRNA podgenomu S. Analizowane genotypy obejmowały wszystkie główne strefy klimatyczno-opadowe Izraela. Genotypy *B. hybridum*, których ekspresja rDNA podgenomu S przekraczała 10% w korzeniach przybyszowych, występowały w różnych strefach, co sugeruje, że miejsce występowania nie wydaje się wpływać na dominację jądrową u *B. hybridum*. Podsumowując należy stwierdzić, że rezultaty niniejszej pracy poszerzają naszą wiedzę na temat podstaw molekularnych ND oraz złożonych interakcji między ekspresją genów a mechanizmami epigenetycznymi na poziomie populacyjnym.

W rozdziale piątym (Dyskusja) Autor podsumował badania wykonane w swojej ramach rozprawy. W pierwszym podrozdziale tej sekcji Doktorant przedstawił dogłębne analizy genetyczne i epigenetyczne mechanizmów dominacji jądrowej u *B. hybridum*. Skoncentrował się na analizie struktury i ekspresji genów rRNA 35S oraz ich ewolucji w różnych genotypach tego organizmu. W większości badanych genotypów *B. hybridum* zidentyfikowano dwa typy 35S rDNA, pochodzące odpowiednio z podgenomu D i S. Stwierdzono też, że różnice w lokalizacji 35S rDNA w genomie wpływają na ich aktywność transkrypcyjną. Wskazał też różne scenariusze ewolucji 35S rDNA, w tym utrzymanie obu homologów oraz eliminację jednostek rDNA jednego ancestor. **Jednakże, w mojej ocenie, aby stwierdzić zasadność drugiego scenariusza, możnaby przeprowadzić badanie kilku bądź kilkunastu pokoleń uzyskanych drogą samozapylenia. Wartościowe w tym aspekcie byłyby badania sztucznego mieszańca *B. distachyon* x *B. stacei* i jego pokoleń potomnych. W tym miejscu chciałbym zadać pytanie, czy znane są przykłady zasugerowanych powyżej badań? Jak Doktorant odnosi się do idei analizy kilku pokoleń wyprowadzonych z danego genotypu *B. hybridum* (naturalnego lub/i sztucznie otrzymanego)?**

W dalszej części Dyskusji Autor wykazał, że loci 35S rDNA występujące w subgenomie D charakteryzują się niższym poziomem metylacji. Odnotował też zmniejszenie rozmiaru sekwencji locus 35S rDNA z podgenomu S w niektórych genotypach, co mogło wynikać z zmian strukturalnych (mutacji). Co bardzo istotne, badania Doktoranta nad różnymi genotypami *B. hybridum* wykazały, że

ND jest stabilne w niektórych tkankach, ale może ulegać regulacji w toku rozwoju rośliny, zwłaszcza w korzeniach przybyszowych. W dalszej części (sekcja 5.1.1) na podstawie analizy homogeniczności regionów ITS1 i 18S rDNA stwierdzono wyższy poziom podobieństwa w regionie ITS1 *B. stacei* w porównaniu z ITS1 (Bs) w *B. hybridum*. W *B. hybridum* (przynajmniej w analizowanych genotypach), 35S rDNA podgenomu S był wyciszony w większości badanych tkanek. Autor stwierdził, że niższy poziom homogeniczności w 35S rDNA pochodzącym od *B. stacei* w *B. hybridum* może być związany z akumulacją mutacji w jednostkach rDNA, które nie są transkrybowane. W związku z tym ITS1 w *B. stacei* jest nieco bardziej homogeniczne. Pomimo wykrycia polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w sekwencjach ITS1, wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że ten region jest silnie konserwatywny.

W kolejnej części (5.2) rozdziału Dyskusja, Autor wskazał, że dominacja jąderkowa jest zjawiskiem tkankowo specyficznym. Ekspresja genów 35S rRNA jest istotnie wyższa w korzeniach i kalusie niż w dojrzałych liściach w różnych gatunkach roślin. Z literatury wiemy, że fluktuacje w stabilności ND występują w różnych organach roślin. W przypadku *Arabidopsis suecica*, ND jest nieobecna podczas embriogenezy, ale staje się zauważalna we wczesnym okresie postembrionalnym w zarodkowych i korzeniowych merystemach wierzchołkowych. W przypadku allopoliploidów jednoliściennych, takich jak mieszańce pszenicy i żyta, ND obserwowana jest znacznie wcześniej. W niniejszej pracy, Autor wskazuje, że ND, na przykładzie genotypu ABR 113, może być niezależne od stosunku obu typów 35S rDNA. Różnice w ekspresji genów 35S rRNA obserwowano także między różnymi genotypami i tkankami, co sugeruje złożone i indywidualne wzorce ekspresji genów rRNA. Autor słusznie podkreśla również, że wyciszanie genów 35S rRNA może wynikać z restrykcyjnych modyfikacji epigenetycznych bądź stałej inaktywacji poprzez gromadzenie mutacji prowadzących do pseudogenizacji.

W kolejnym podrozdziale Dyskusji Autor przeanalizował rolę metylacji DNA w regulacji dominacji nuklearnej (ND) w badanych genotypach *B. hybridum*. Wykorzystując enzym restrykcyjny *PstI*, zdolny do identyfikowania metylacji cytozyny w kontekście CHG, zidentyfikował w swoich badaniach zróżnicowane wzorce metylacji w homoeologach 35S rDNA tego gatunku. Wyniki wskazują pozytywną korelację między demetylacją jednostek 35S rDNA z podgenomu S a ich transkrypcją. Szczególnie interesujący genotyp 2.2.2 wykazał brak metylacji 35S rDNA z podgenomu S we wszystkich analizowanych tkankach. Dane dotyczące metylacji są zgodne z wynikami ekspresji uzyskanymi za pomocą technik RT-CAPS i RT-qPCR, co potwierdza kluczową rolę metylacji DNA w regulacji ND w *B. hybridum*. Autor w tym miejscu odniósł się do wcześniejszych badań, które również wskazywały na istotną funkcję metylacji DNA w mechanizmie epigenetycznym kontrolującym ekspresję genów rRNA i ND. Wartościowe jest także odniesienie do innych prac, które wykazały, że obecność metylacji DNA często prowadzi do represji genów 35S rRNA. Uważam, że powyższe badania poszerzają nasze zrozumienie roli metylacji DNA w regulacji ND.

W ostatniej części Dyskusji, Autor udowadnia tezę, iż dominacja jąderkowa ND w *B. hybridum* jest niezależna od efektu matczynego. W przypadku badanych w niniejszej pracy genotypów *B. hybridum*, analiza regionu genu trnLF chloroplastu wykazała brak wpływu efektu matczynego na ND, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami nad innymi gatunkami roślin. Wyniki te potwierdzają dotychczasowe przesłanki, że ND nie jest związane ani z efektem matczynym, ani ojcowski, co potwierdza się w wielu przypadkach zarówno w roślinach, jak i u zwierząt.

W rozdziale szóstym Autor przedstawił dziesięć wniosków, co do konstrukcji których nie mam uwag.

Z obowiązku recenzenta ocenie poddałem także jakość strony edycyjnej. W tym miejscu pragnę podkreślić wysoką staranność w opracowaniu manuskryptu, przejrzystość jego konstrukcji oraz profesjonalne przygotowanie edycyjne. Z racji, iż język angielski nie jest moim ojczystym językiem, nie czuję się uprawniony do oceny poprawności gramatycznej i stylistycznej pracy. Jednakże jako osoba używająca na co dzień język angielski, czytająca oraz publikująca w tym języku, uważam, że praca pod względem językowym jest napisana zrozumiale i poprawnie.

Podsumowując moją analizę merytoryczną wyników badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej, stwierdzam, iż dostarczyły one nowych danych, które pozwalają zrozumieć ewolucję i regulację genów rRNA w *B. hybridum*. Ważnym atutem tej pracy jest wykorzystanie różnorodnych technik molekularnych do zbadania różnych aspektów tego problemu, co stanowi potężne narzędzie w zrozumieniu złożonych mechanizmów działających w obrębie genomu allopoliploidalnego gatunku, jakim jest *B. hybridum*.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa Pana Serhii'a Mykhailyk'a pt.: „Evolution of 35S rRNA gene loci in selected genotypes of allotetraploid model grass *Brachypodium hybridum*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej i praktycznej Doktoranta, a także umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w Ustawie 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – tekst jednolity: Dz. U. 2023 poz. 742. Pragnę zaznaczyć, iż wymienione przeze mnie w niniejszej recenzji uwagi oraz komentarze mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie obniżają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko.

Wnioskuje do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pana Serhii'a Mykhailyk'a do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Radzików, dnia 8 stycznia 2024 roku