

## Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej pt. „Genomika porównawcza linii ogórka *Cucumis sativus* L. uzyskanych w wyniku transgenezy oraz regeneracji *in vitro*”

Kluczowym punktem w historii ludzkości był rozwój rolnictwa. Działanie to koncentrowało się głównie na zróżnicowanej selekcji udomowionych roślin uprawnych. Początkowo selekcja obejmowała dwie kluczowe cechy, a były to indukcja kiełkowania i zmniejszona dyspersja nasion. Udomowienie upraw spowodowało ekspansję rolnictwa na inne obszary o zróżnicowanych warunkach środowiskowych, gdzie selekcja pod kątem nowych cech, takich, jak jakość odżywcza czy odporność na patogeny była kontynuowana. Przykładowo poprawiono wartość odżywczą ziemniaków przez wyselekcjonowanie roślin o niższym stężeniu glikoalkaloidów, rzepak o niższej zawartości glukozyolanów a len o niższej cyjanogenezie. Jednak w kilku przypadkach poprawa, jakości odżywczej może działać na niekorzyść poprawy innych cech. Ziemniaki o obniżonej zawartości glikoalkaloidów charakteryzowały się niższą odpornością na skoczka ziemniaka; zmniejszona cyjanogeneza w lnie skutkowała obniżoną odpornością roślin na szkodniki.

Następnie, w toku doskonalenia roślin uprawnych, hodowcy rozszerzyli spektrum odmian poprzez mutagenezę. Często stosowano promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV, traktowanie kwasem azotawym, azydkiem sodu, środkami alkilującymi, takimi jak metanosulfonian etylu albo hydroksyloamina. Źródłem dzisiejszych upraw są krzyżówki wewnątrzgatunkowe i międzygatunkowe wykorzystujące istniejącą zmienność zarówno naturalną jak i wzmiankowaną indukowaną.

Zmienność klimatu, rozprzestrzenianie się patogenów, przemieszczanie się roślin i produktów roślinnych między regionami świata stanowią wystarczający argument do powiększania różnorodności genetycznej. Ograniczona różnorodność genetyczna wraz z intensywnym stosowaniem agrochemikaliów do zwalczania chorób roślin może spowodować rozwój nowych szczepów patogenów i w rezultacie niższą produkcję rolniczą.

Ponadto rosnąca świadomość społeczna dotycząca zdrowej diety oraz oczekiwanie podwojenia produkcji żywności wysokiej, jakości do 2050 r. są ważnym sygnałem dla pozyskiwania nowych odmian.

Dlatego też niezmiennie wielkim wyzwaniem dla nauki jest prowadzenie prac nad różnorodnością genomów roślinnych. W ostatnich dziesięcioleciach stosowano różne podejścia do tworzenia platformy dywersyfikacji genomu roślinnego. Rozwój technologii inżynierii genetycznej w ostatnim czasie pozwolił na wygenerowanie nowych cech nieistniejących w warunkach naturalnych i jest to technologia o wysokiej specyficzności. Technologia ta, atrakcyjna naukowo, jest jak dotychczas niezastąpiona w badaniach genów i genomów roślin na całym świecie. W Polsce wiele instytucji było zaangażowanych w wykorzystanie tej technologii do badania funkcji genów, ale tylko nieliczne wykorzystywały tą technologię do wygenerowania nowych roślin, których potencjalne ulepszone właściwości zweryfikowano przez uprawę polową.

W ostatnich kilku latach intensywnie promowaną na świecie jest technika edycji genomu, która ma w założeniu zrewolucjonizować wykorzystanie inżynierii genetycznej w rolnictwie. Spośród trzech głównych technik edycji genomu, ostatnio opracowana CRISPR oraz CRISPR połączona z retronami (CRISPEY) jest szczególnie obiecująca i silnie promowana w światowych mediach. Mimo to żadna uprawa poddana edycji CRISPR nie została jeszcze wprowadzona na rynek i nie oczekuje się, że wkrótce się to zmieni, bowiem wszystkie techniki edycji genów wpisują się w technologię GM i podlegają tym samym restrykcjom.

Pomimo, że GMO odniosły duży sukces w nauce wskazując drogę do kontrolowanej dywersyfikacji roślin i doskonalenia produktów surowcowych z nich pochodzących oraz, że ich bezpieczeństwo dla ludzi i środowiska było poprzedzone latami intensywnych badań to żadne, przynajmniej w naszym kraju, nie zostały zatwierdzone do uwolnienia do środowiska a tym samym do urynkwienia i w zasadzie mogą stanowić jedynie cenne źródło wiedzy o funkcji genów.

Tym niemniej przedkładanych jest coraz więcej argumentów wskazujących na konieczność opracowania technologii dywersyfikacji roślin ze względu na zmieniający się klimat i nie tylko. Przykładowo powszechne stosowanie uproszczonych systemów upraw na dużym areale w znormalizowanych warunkach i z użyciem maszyn wielkoskalowych ma ogromny wpływ na siedliska rolnicze, strukturę gleby i organizmy zasiedlające glebę, co wiedzie do erozji dziedzictwa gatunkowego i różnorodności odmian. Monokultury roślin uprawnych stanowią tendencję

ograniczającą różnorodność gatunków, przyczyniają się do nadmiernej eksploatacji gleb, a także czynią uprawy bardziej podatnymi na szkodniki i ekstremalne warunki klimatyczne. Obserwowane łączenie małych pól skutkuje zanikaniem dzikich siedlisk, nawożenie modyfikuje skład zbiorowisk roślinnych na obrzeżach pól, a pestycydy mają bezpośredni i pośredni wpływ letalny lub subletalny na reprodukcję roślin. Według Europejskiej Agencji Środowiska, w porównaniu z 2015 r. stan ochrony siedlisk rolniczych uległ ogólnemu pogorszeniu: stan dobry zmniejszył się z 14% do 12%, a stan zły wzrósł z 39% do 45%. Tylko 8% siedlisk rolniczych wykazuje tendencję do poprawy, podczas gdy 45% ulega pogorszeniu.

Przewiduje się, że zmniejszona bioróżnorodność doprowadzi ostatecznie do spadku wydajności rolnictwa. Wraz z Zielonym Ładem Unia Europejska zobowiązała się do wspierania transformacji ekologicznej i wyznaczyła rygorystyczne cele w zakresie redukcji pestycydów, nawozów i antybiotyków, a także zobowiązała się do odwrócenia tendencji degradacji różnorodności biologicznej do 2030 r. Podkreśla się, że agrobioróżnorodność jest głównym motorem transformacji ekologicznej rolnictwa i generuje rozwiązania, odwracające degradację gleby, poprawiające jej żyzność i zdrowotność roślin uprawnych. Starannie zaprojektowane wykorzystanie różnorodności gatunków uprawnych może przyczynić się do zamknięcia naturalnych pętli poprzez recykling składników odżywczych, utrzymanie materii organicznej gleby i zmniejszenie zapotrzebowania na chemiczne pestycydy i nawozy oraz tworzenie korzystniejszych siedlisk dla pożytecznych mikroorganizmów i makroorganizmów. Szerszy zakres gatunków i odmian jadalnych jest również niezbędny dla bardziej zróżnicowanej, kulturowo akceptowalnej, zdrowej i uwzględniającej zasoby naturalne diety.

Dlatego też w dalszym ciągu i niezmiennie wielkim wyzwaniem dla nauki jest prowadzenie prac nad różnorodnością genomów roślinnych. Jeśli jednak przedstawione obiecujące technologie zróżnicowania genetycznego roślin uprawnych nie mogą być akceptowalnym przez rynek źródłem nowych ulepszonych roślin to, jaka jest alternatywa?

Niedawno pokazano, że stres spowodowany uprawą roślin w kulturze *in vitro* jest głównym czynnikiem sprawczym zarejestrowanych różnic proteomicznych między ryżem GM (nadekspresja czynnika transkrypcyjnego) i negatywnym segregantem a roślinami niezmodyfikowanymi genetycznie (Proteomics 15, 124-134, 2015; Scientific Reports 7: 10624, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-09646-8). Zbadanie podstaw tych różnic stało się ważne z dwóch powodów. Po pierwsze może być pomocne w ocenie znaczenia zmian spowodowanych przez transgenezę w porównaniu do tych wywołanych przez środowisko a zatem w ocenie ryzyka upraw genetycznie zmodyfikowanych a po drugie, że odróżnicowanie i ponowna regeneracja roślin może być źródłem nowych odmian. Wyniki badań wielopokoleniowych przekonują, że stres środowiskowy, jakim jest kultura *in vitro* powoduje więcej zmian proteomicznych i transkryptomicznych niż transgeneza oraz, że zmiany wywołane transgenezą są krótkotrwałymi zmianami fizjologicznymi słabnącymi w pokoleniach. W obliczu tych wyników okazuje się, że obawy dotyczące bezpieczeństwa biologicznego upraw transgenicznych są wątpliwe a biorąc pod uwagę trwałość zmian spowodowanych stresem środowiskowym kultury *in vitro* jawią się, jako alternatywa dla tworzenia bioróżnorodności roślin uprawnych.

W tej dysertacji podjęto się rozwiązania podobnego zagadnienia, chociaż na innym bardziej zasadnym molekularnym poziomie. Zadeklarowanym jej celem było zbadanie wpływu transformacji i regeneracji roślin w kulturach *in vitro* na indukcję ich zmienności genomicznej. Obiektem badań były transformanty i regeneranty ogórka natomiast metodą identyfikującą zmienność było sekwencjonowanie genomu i jego bioinformatyczna analiza w odniesieniu do ustalonej linii referencyjnej B10. Spodziewanym rezultatem miała być analiza technik genomicznych, ustalenie optymalnego sposobu pozyskania adnotowanego genomu, ocena udziału stresu środowiskowego w transgenezie i wskazanie postępowania korzystnego dla tworzenia bioróżnorodności wśród roślin uprawnych na przykładzie ogórka.

Postęp w genetyce roślin uprawnych notowany w ostatnim czasie wynika z coraz lepiej zoptymalizowanych i o wysokiej rozdzielczości technologii identyfikujących polimorfizmy w genomie, w tym technik opartych na mikromacierzy, a ostatnio, wysokowydajnego sekwencjonowania DNA. Szybki rozwój technologii sekwencjonowania i metod bioinformatycznych w ostatnich dekadach spowodował, że poznano sekwencję nukleotydową DNA genomu wielu organizmów, jej wstępny opis, ustalenie ogólnych praw rządzących genomami, poznanie zasad ewolucji genomów oraz

poznanie zmienności międzyosobniczej genomów tego samego gatunku. Sekwencjonowanie całego genomu wraz ze zmapowaniem struktur i rozkładem funkcjonalnych elementów chromatyny wzdłuż sekwencji genomu stanowi najbardziej kompletny opis indywidualnej zmienności genomowej. Kompletna i dobrze opisana sekwencja genomu stanowi odpowiedni i wystarczający materiał źródłowy do badań genomicznych.

W rzeczywistości jednak istnieje wiele komplikacji związanych z sekwencjonowaniem genomu. Po pierwsze, geny o szczególnie dużym znaczeniu są wysoce polimorficzne i mają wiele paralogów, co czyni je trudnymi w składaniu w większe jednostki strukturalne. Po drugie, nie ma jednej prawdziwej sekwencji dla gatunku z powodu indywidualnej zmienności genetycznej. Po trzecie, zasadniczo niemożliwe jest sekwencjonowanie i składanie wszystkich nukleotydów w genomie ze względu na regiony heterochromatyny wokół centromerów i telomerów oraz inne regiony wysoce powtarzalnych sekwencji, które nie są zbyt dobrze scharakteryzowane nawet w już dobrze poznanych genomach.

Po czwarte, zawsze będzie obecny pewien poziom błędów w scharakteryzowanej sekwencji genomu, co wynika z błędów sekwencjonowania, jak i kolejności bloków sekwencji wynikających z niedoskonałości narzędzi służących do ich składania.

Pomimo to również w tej pracy ustalono schemat postępowania wiodący do pozyskania informacji o organizacji genomów somaklonalnych i transgenicznych typów ogórka. Wykorzystano platformę illumina do resekwencjonowania tych genomów.

Informacje o schemacie postępowania i metodzie użytej w procesie sekwencjonowania, jakości sekwencji genomowej, metod weryfikacji tej, jakości, opis algorytmów komputerowych do złożenia podzielonej sekwencji na coraz dłuższe ciągi sekwencji ostatecznie umieszczonych na chromosomie, opis i metody fazy obliczeniowej i fazy adnotacji i ostatecznie pozyskanie pełnego opisu genomu jest szeroko opisany w wielu materiałach źródłowych a w tym w dołączonych do dysertacji publikacjach Autorki dysertacji i nadto podsumowany w samej dysertacji. Zaiste jest nie lada wyzwaniem opracowanie sekwencji genomu wymagającym gruntownej znajomości genetyki molekularnej jak również sprawnego poruszania się w bogatym asortymencie narzędzi bioinformatycznych. Przyniesione w rozprawie informacje o technologiach bioinformatycznych a w tym własnych osiągnięciach w tym zakresie zostały krytycznie zanalizowane przez autorkę dysertacji, co świadczy o jej znakomitym przygotowaniu do podjętego celu badań.

W tej rozprawie doktorskiej posiłkując się materiałem biologicznym w postaci dwóch odrębnie uzyskanych typów ogórka, z których jeden jest wytworzony przez transgenezę a drugi przez odróżnicowanie komórkowe i regenerację rośliny w kulturze *in vitro*, poddano ich genomy gruntownej różnicowej analizie. Odniesienie wyników tej analizy do referencyjnej linii ogórka miało skutkować zdefiniowaniem udziału procesu *in vitro* i transgenezy w potencjalnej bioróżnorodności tych roślin.

Resekwencjonowanie genomów somaklonów i transgenów i odniesienie wyników do genomu referencyjnej linii ogórka B10 stanowiło podstawę różnicowej analizy polimorfizmów. Miejsca integracji *taumatyny II* w liniach transgenicznych określono przez mapowanie odczytów do genomu referencyjnego i do sekwencji wektora użytego do transformacji.

W każdej z trzech wyselekcjonowanych linii transgenicznych gen *taumatyny* wbudował się w innym miejscu genomu. Ustalono, że wszystkie trzy linie legitymują się zbliżoną liczbą polimorfizmów oraz zbliżonym ich rozmieszczeniem. W pracy sugeruje się, że niewielkie zróżnicowanie w polimorfizmach pomiędzy liniami transgenicznymi może wynikać z podobieństwa w prowadzeniu kultury *in vitro* wykorzystanej do regeneracji roślin w procesie transformacji.

Z trzech analizowanych linii somaklonalnych dwie różnią się całkowitą liczbą wytypowanych zmian w genomie, ale ich rozmieszczenie jest zbliżone. Interesującym jest, że linia S3 o największej spośród pozostałych liczbie zmian w genomie, fenotypowo różni się najmniej w odniesieniu do linii referencyjnej. Rozmieszczenie polimorfizmów w genomie tej linii różni się od tych zidentyfikowanych w pozostałych dwóch liniach. Autorka dysertacji sugeruje, że za tą niespójność odpowiadają inne warunki hodowli *in vitro*, linia S3 pochodzi z innego zdarzenia hodowlanego. Nasuwa się sugestia, że ogólnie przyjęta opinia o przypadkowości zmian genomicznych w procesie *in vitro* niekoniecznie jest prawdziwą, istnieje związek, między co najmniej rozmieszczeniem polimorfizmów w genomie i bliżej nieokreślonym parametrem hodowli *in vitro*.

Porównując liczbę wytypowanych zmian w genomach linii transgenicznych i somaklonalnych zauważa się niższą ich wartość w transformantach, pomimo, że do ich wytworzenia standardowo stosuje się proces regeneracji odróżnicowanych komórek.

Autorka dysertacji wnioskuje, „że zmiany w genomie roślin transgenicznych są wynikiem poddania ich etapowi regeneracji z zastosowaniem kultur *in vitro*, a nie samego procesu transformacji i wprowadzenia do genomu transgenu”.

Z przedstawionych badań wynika, że w obu typach roślin najbardziej podatnymi na zmiany są międzygenowe obszary chromatyny a najmniej kodujące obszary genomu. Nadto mając za podstawę analizę polimorfizmów przewidywana jest podobna zmienność na poziomie funkcjonalnym w obu typach roślin. Podobieństwo rozmieszczenia polimorfizmów w genomach obu typów roślin ponownie skłoniło autorkę dysertacji do wysunięcia wniosku o nadrzędnym znaczeniu stresu hodowli *in vitro* w zmianach genomicznych transformantów.

Reasumując wyniki badań przedstawione w tej pracy nadają jej odkrywczy charakter, dlatego, że na poziomie genomu demonstruje stresogenny charakter etapu regeneracji w procesie transgenezy, że rozmiar zmian spowodowanych tym stresem jest niespodziewanie większy niż wbudowanie transgenu do genomu, że zmiany pochodzenia stresogennego są długotrwałe a w rezultacie tych ustaleń obawy przed ryzykiem upraw GM są nieuzasadnione.

Z pewnością wyniki badań precyzyjnie odnoszą się do postawionego celu: zjawisko somaklonalnej wariacji może być źródłem poszukiwanej przez hodowców roślin uprawnych zmienności genetycznej. Autorka nadmienia jednak, że brak jest zależności między fenotypem roślin a liczbą polimorfizmów genomowych.

Z obowiązku czytelnika i recenzenta i tylko w odniesieniu do bioróżnorodności dodać należy, że od niedawna rozwijana technologia OLIGO (ODN) oparta o indukcję zmian epigenetycznych jawi się również, jako obiecująca dla zwiększenia oczekiwanej zmienności roślin uprawnych (BMC Plant Biol 14, 261, 2014; Front. Plant. Sci., 8, 755, 2017). Technologia nie ma jak dotychczas tak zaawansowanych badań genomicznych jak te przedstawione w tej pracy.

Reasumując, oceniana rozprawa doktorska składa się z części opisowej i dokumentacyjnej. W części opisowej podsumowano dotychczasowy stan wiedzy na temat metod dywersyfikacji genetycznej roślin wyodrębniając te, które stanowią przedmiot badań oraz metod sekwencjonowania kwasów nukleinowych i narzędzi bioinformatycznych służących do ich analizy a w tym do ich identyfikacji i określenia potencjalnej funkcji.

Na szczególne podkreślenie zasługuje precyzyjna selekcja informacji literaturowych, autorka zwraca uwagę i bardzo dokładnie opisuje tylko te obszary wiedzy i te elementy postępowania eksperymentalnego, które dalej, już we własnych doświadczeniach będą podejmowane i analizowane. Zarysowując ogólny obraz procesu sekwencjonowania, składania i identyfikacji sekwencji DNA w genom i przedkładając bardzo szczegółowo znaczenie tego procesu dla rozwoju genomiki i jej wykorzystania do zrozumienia adaptacyjnej zmienności roślin przekonuje o swojej głębokiej wiedzy i umiejętności posługiwania się ciągle dostosowywanymi technikami i narzędziami badawczymi.

Szczególnego podkreślenia wymaga analityczne rozpatrzenie opisanych w literaturze możliwych sposobów efektywnego składania odczytów DNA i adnotacji uzyskanych sekwencji. Rezultatem tej analizy stało się opracowanie referencyjnej sekwencji genomu ogórka i odniesienie do niej dwóch nowych indywidualnych genomów, somaklonalnego i transgenicznego. Każdy etap tego różnicowego postępowania jest syntetycznie opisany. Złożoność postępowania bioinformatycznego i ogromna ilość rozmaitych programów i metod zwykle opatrzonych skrótami jak również pewna swoistość nazewnicza jest, co prawda zalecana, ale też sprawia niemałą trudność w odbiorze tej pracy.

Najistotniejszą częścią pracy stanowiącą również jej cel było porównanie zróżnicowania genetycznego trzech typów roślin, a w tym linii genetycznie zmodyfikowanych, linii z odróżnicowanej hodowli komórkowej i zregenerowanych, których zmienność genetyczną odniesiono do linii referencyjnej. W części dokumentacyjnej na wstępie szczegółowo i krytycznie scharakteryzowano narzędzia i metodykę sekwencjonowania genomu, weryfikacji sekwencji i analizy bioinformatycznej, co przekonuje nie tylko o umiejętności doktorantki posługiwania się nowymi technologiami, ale przede

wszystkim nie pozostawia wątpliwości, że prezentowane wyniki badań w istocie odzwierciedlają rzeczywistą organizację genomu analizowanych linii ogórka. W szczególności podkreślenia wymaga staranność w uzyskaniu i opisie sekwencji genomu referencyjnego ogórka kluczowego dla analizy porównawczej zdywersyfikowanych genomów.

Najważniejszym pierwszym osiągnięciem tej pracy jest wniosek, że uprawa in vitro jest procesem stresogennym indukującym zmiany genomiczne w roślinach w porównaniu do roślin kontrolnych.

Drugim ważnym wnioskiem jest, że stres spowodowany uprawą roślin w kulturze in vitro jest głównym czynnikiem wpływającym na różnice genomiczne roślin GM i roślin niezmodyfikowanych genetycznie

Trzecim zasadnym wnioskiem wynikającym z badań jest, że stres środowiskowy powoduje znacznie więcej zmian genomicznych niż transgeneza. Intrygującym jest, że chociaż transgeny wbudowują się w różne miejsca genomu to ilościowe różnice polimorfizmów pomiędzy nimi są relatywnie niewielkie i w odniesieniu do genomów z kultur in vitro zdecydowanie mniejsze ilościowo. Sugeruje to, że implementacja transgeny zmniejsza wrażliwość genomu na dalsze jego zmiany lub, że segreganty mające sumaryczne zmiany, czyli inkorporowany transgen i zmiany charakterystyczne dla hodowli in vitro są letalne. Wydaje się, że lepszym odniesieniem dla roślin transgenicznych byłyby negatywne segreganty pochodzące z odrębnego zdarzenia transformacyjnego.

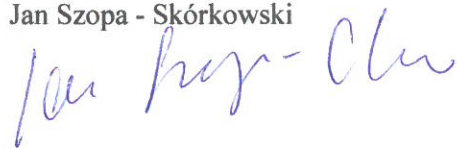
Czwartym wnioskiem jest, że stres środowiskowy jest trwały w pokoleniach. Ten wniosek może budzić emocje, bowiem rośliny uprawiane na polach są nieuchronnie poddawane różnym stresom środowiskowym a zatem zmianom genomicznym i chociaż strategii nowoczesnego rolnictwa starają się minimalizować niepożądane bodźce, to jednak wiele czynników pozostaje nieprzewidywalnych. Czy doktorantka jest w stanie odpowiedzieć na pytanie jak długi w pokoleniach jest okres „pamięci” stresu środowiskowego?

Kolejnym ważnym wnioskiem jest ten, że wbrew silnej opozycji, co do rozwoju upraw GM, wyniki w ostatnim czasie prowadzonych intensywnych badań na podobieństwo tych przedstawionych w tej pracy przekonują o braku ryzyka w uprawie roślin GM.

Zgromadzony przez doktorantkę materiał eksperymentalny stanowi bogate źródło informacji o zróżnicowaniu genetycznym występującym w naturalnych populacjach roślin i związanym z procesem adaptacji środowiskowej. Będąc w posiadaniu tak unikalnego materiału eksperymentalnego spodziewanym jest, że dalszy rozwój badań genomicznych ogórka będzie równie dynamiczny jak dotychczas.

W konkluzji pragnę stwierdzić, że recenzowana rozprawa jest o wysokiej wartości poznawczej. Na podstawie powyższego zwracam się do Rady Instytutu Nauk Ogrodniczych SGGW z prośbą o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jan Szopa - Skórkowski



Wrocław 12 kwietnia 2022

Rada Instytutu Nauk Ogrodniczych  
SGGW

12 kwietnia 2022

Wnioskuje o przyznanie stosownej nagrody Pani mgr inż. Agnieszce Skarzyńskiej mając za podstawę odkrywczy charakter rozprawy doktorskiej, której wyniki zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach z listy filadelfijskiej. Przedstawiona w pracy dokumentacja przekonuje o nadrzędnym znaczeniu stresu środowiskowego w modyfikacji genomu rewolucjonizując dotychczasowy pogląd na temat transgenezy i ryzyka uwolnienia GMO do środowiska.

Jan Szopa-Skórkowski

