

RECENZJA

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

Roślinne kultury *in vitro* to często stosowana technologia, mająca różnorodne zastosowania zarówno w badaniach podstawowych, jak również w hodowli nowych odmian oraz rozmnażaniu wegetatywnym roślin na skalę produkcyjną. Podczas stosowania tej technologii z reguły dąży się do uzyskania regenerantów tożsamyh genetycznie z roślinami wyjściowymi. Zaobserwowano jednak, że w wyniku stresu fizjologicznego, jakiemu poddane są komórki roślinne w kulturach *in vitro*, pojawiają się również rośliny o zmienionym fenotypie, a zjawisko to określa się zbiorczo jako zmienność somaklonalną. Jej podłoże jest złożone, ale część zmian mająca charakter dziedziczny jest związana z mutacjami powstałymi w toku kultury. Tym samym czas prowadzenia kultury jest jednym z głównych czynników warunkujących akumulację tych zmian. Kultury *in vitro* są również wykorzystywane w procesie transformacji genetycznej roślin, istnieje zatem potrzeba weryfikacji, czy wbudowanie transgenu w genom roślinny indukuje zmiany genetyczne w kontekście całego genomu, czy też modyfikacja jest ograniczona do rejonu integracji transgenu.

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie Autorka opisała wyniki badań obejmujących identyfikację wariantów strukturalnych (substytucji nukleotydowych i krótkich insercji/delecji), obecnych w genomach linii ogórka uzyskanych po długoterminowych kulturach *in vitro* oraz linii transgenicznych, w oparciu o wyniki wysokowydajnego resekwencjonowania całych genomów tych linii i porównania odczytów do sekwencji genomu referencyjnego linii B10 wyprowadzonej z odmiany Borszczagowski, podobnie jak wszystkie resekwencjonowane linie.

Struktura pracy

Zasadniczą część dysertacji stanowią dwa artykuły naukowe w języku angielskim, opublikowane w latach 2020-2021 w czasopiśmie naukowych z dziedziny nauk o życiu, tj. *Gene* (IF₂₀₂₀=3,688) i *Physiol. Mol. Biol. Plants* (IF₂₀₂₀=2,391) i *BMC Genomics* (IF₂₀₁₇=3,730) oraz dwa doniesienia opublikowane w latach 2017 i 2018 w materiałach z cyklicznej konferencji indeksowanej w Web of Science (*Proc. SPIE*). Rozprawa została uzupełniona o ogólne

Streszczenia w języku polskim i angielskim; spis skrótów; spis treści; oraz typowe rozdziały obejmujące 'Przegląd literatury' skrótowo przedstawiający aktualny stan wiedzy; 'Cele badań i hipotezy badawcze' określające obszar i założenia pracy; 'Materiał i Metody' charakteryzujące wykorzystane w badaniach materiały roślinne oraz krótko podsumowujące zastosowane procedury badawcze; 'Omówienie Wyników i Dyskusję' opisowo przedstawiające najważniejsze osiągnięcia pracy; 'Wnioski' podsumowujące te osiągnięcia w ośmiu punktach; 'Spis Literatury' oraz oświadczenia autorów o zakresie ich udziału w publikacjach stanowiących podstawę pracy doktorskiej.

Streszczenia właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Autorkę.

Przegląd literatury przedstawia podstawowe zagadnienia związane z podjętym przez Autorkę problemem i stanowi wprowadzenie w tematykę badawczą realizowaną w pracy doktorskiej. Autorka podjęła próbę zdefiniowania zjawisko zmienności genetycznej i jej przyczyn, opisała metody indukowania zmienności genetycznej *de novo*, a także opisała możliwości wykorzystania technik sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing; NGS*) w badaniach zmienności wewnątrzgatunkowej.

Cele badań i hipotezy badawcze zostały jasno zdefiniowane. Cel ogólny został uszczegółowiony w postaci czterech celów szczegółowych. Autorka sformułowała również cztery hipotezy badawcze.

W rozdziale Materiał i metody Autorka skrótowo scharakteryzowała linie ogórka wykorzystane w badaniach, a także podsumowała zakres metod eksperymentalnych, od izolacji genomowego DNA poprzez jego sekwencjonowanie, analizy bioinformatyczne uzyskanych odczytów, po eksperymentalną weryfikację poprawności identyfikacji polimorfizmów DNA różnicujących badane linie od referencji.

W rozdziale Omówienie Wyników i Dyskusja Autorka omówiła łącznie (bez wyodrębniania podrozdziałów), na 14 stronach, najważniejsze wyniki badań. Ten syntetyczny przegląd stanowił dobre wprowadzenie do lektury publikacji źródłowych zamieszczonych w dalszej części dysertacji. Na tej podstawie Autorka sformułowała również osiem opisowych Wniosków.

Spis literatury obejmuje ok. 70 pozycji, które stanowią najważniejsze artykuły naukowe z wiodących światowych czasopism z ostatnich kilkunastu lat oraz ważne prace opublikowane wcześniej.

Oświadczenia Autorów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że udział Pani mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej w realizacji publikacji wchodzących w skład rozprawy był znaczący i w pełnym zakresie wypełnia sformułowane przez ustawodawcę, w odniesieniu do prac zbiorowych, kryterium indywidualnego wkładu kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników.

Merytoryczna ocena pracy

Skala rearanzacji genomowych pojawiających się w toku roślinnych kultur *in vitro*, a co za tym idzie, zakres zmienności somaklonalnej mającej charakter dziedziczny, to bardzo interesujący problem badawczy. Technologia wysokowydajnego sekwencjonowania genomowego DNA po raz pierwszy pozwala w sposób systematyczny zidentyfikować takie rearanzacje. Rozprawa Pani mgr Agnieszki Skarzyńskiej przedstawia wyniki prac eksperymentalnych, których efektem było uzyskanie nowych informacji na ten temat. Doktorantka ograniczyła się do identyfikacji substytucji nukleotydowych oraz niewielkich, kilkunukleotydowych indeli, pomijając analizę innych wariantów strukturalnych. Jak sądzę, było to spowodowane wyborem technologii sekwencjonowania generującej krótkie odczyty. Tym niemniej, identyfikacja większych wariantów strukturalnych mogłaby rzucić dodatkowe światło na dynamikę zmian genomowych w kulturach *in vitro*. W ramach przeprowadzonych prac (1) przeprowadzono złożenie *de novo* genomów linii somaklonalnych ogórka, porównując jednocześnie przydatność różnych narzędzi bioinformatycznych do tego celu (publikacja 1); (2) przetestowano narzędzia bioinformatyczne służące identyfikacji polimorfizmów na podstawie odczytów uzyskanych w wyniku wysokowydajnego sekwencjonowania i wybrano optymalną strategię analizy (publikacja 2); (3) określono liczbę i lokalizację genomową polimorfizmów różniących linie zregenerowane po kulturach *in vitro* oraz linie transgeniczne od referencyjnego złożenia linii B10 ogórka (odpowiednio publikacje 3 i 4 oraz (4) precyzyjnie określono położenie i strukturę miejsc integracji transgeny w genomach linii transgenicznych (publikacja 4).

Moje zainteresowanie wzbudził przede wszystkim fakt wyraźnie nierównomiernej dystrybucji wariantów różnicujących linie somaklonalne i transgeniczne od linii referencyjnej (Rycina 3 w publikacji 3 i Rycina 3 w publikacji 4). Czy taka nielosowa dystrybucja oraz fakt, że dla linii S1 i S2 oraz wszystkich linii transgenicznych rejony hiper-zmienne pokrywają się, może być wyjaśniony poprzez założenie, że obserwowane zmiany powstały jeszcze przed założeniem kultur *in vitro*, zatem były obecne już w genomach roślin donorowych (tzn. genom rośliny donorowej nie był identyczny z genomem linii referencyjnej B10)? Jak inaczej wytłumaczyć fakt, że wiele polimorfizmów w tych rejonach było identycznych – jeśli nie pochodzą one od wspólnego przodka, musi istnieć mechanizm ‘wymuszający’ niezależne powstawanie takich zmian w trakcie kultur. W dyskusji wyników przedstawionych w publikacji 3 Autorzy piszą: *„It looks like cells want to regulate important genes by activating mutations in response to long-lasting environmental changes”*. O ile w długotrwałych kulturach można by ewentualnie postulować istnienie presji selekcyjnej (adaptacja komórek do warunków kultury), o tyle w przypadku linii transgenicznych nie wydaje się to możliwe, a sama hipoteza wydaje mi się bardzo daleko idąca... Będę prosił o rozwinięcie tego tematu przez Doktorantkę podczas obrony.

Moje zastanowienie wzbudziło również stwierdzenie o mniejszej częstości zmian obserwowanej w rejonach międzygenowych, w porównaniu z intronami, UTRami i rejonami powyżej i poniżej genów (publikacja 3, str. 5 oraz Tabela 3). Myślę, że może to być wyjaśnione faktem, że w dużej części rejonów międzygenowych nie zidentyfikowano polimorfizmów z uwagi na ich repetytywny charakter. Podzielenie liczby zidentyfikowanych wariantów przypisanych do tych rejonów przez całkowitą długość rejonów międzygenowych prowadzi tym samym do fałszywego wniosku o mniejszej liczbie zmian. Z kolei w polskim opracowaniu Autorka stwierdza, że *„...wyniki potwierdzają mniejszą podatność rejonów kodujących na mutacje i powstawanie zmian w obszarach aktywnych translacyjnie”* (str. 26). Abstrahując od faktu, że chodziło zapewne o rejony aktywne ‘transkrypcyjnie’, uważam, że wynika to z faktu, że mutacje w rejonach kodujących często powodują dysfunkcję skutkującą śmiercią komórek w kulturach, zatem mniejsza liczba mutacji w rejonach kodujących nie wynika z mniejszej ‘podatności na mutacje’ ale raczej jest efektem selekcji.

Zastanawiam się, dlaczego we wnioskach 6 i 7 jako moment indukcji mutacji Autorka wskazała ‘regenerację’, czy też ‘proces regeneracji roślin’. Wydaje mi się, że bez dodatkowych badań trudno stwierdzić, czy mutacje są indukowane wyłącznie na etapie regeneracji, czy też

pojawiają się w całym okresie kultury kalusa lub kultury zawieszinowej. Wskazywałaby na to obserwacja, że liczba zmian była zależna od czasu trwania kultury. Wniosek 8 (*„Lokalizacja wariantów genomowych jest LOSOWA, jednakże w genomie ogórka występują regiony BARDZIEJ PODATNE NA ZMIANY...”*) wydaje mi się wewnętrznie sprzeczny, co z resztą współgra z moimi uwagami przedstawionymi powyżej.

Mam zastrzeżenia do jakości języka angielskiego w publikacjach zamieszczonych w materiałach konferencyjnych, natomiast obie publikacje z czasopism napisane są znacznie lepiej, a błędy są sporadyczne (np. w publikacji 3 w tabeli 4 wskazano ‘6’ synonimicznych cichych mutacji w linii S2, zapewne zabrakło jednej cyfry, z tekstu i z proporcji wynika, że powinno być ok. 60 takich mutacji). Również w polskim opracowaniu Autorka nie ustrzegła się pewnych błędów i uproszczeń. Cały podrozdział 2.1 dotyczący zmienności genetycznej został przygotowany bez powoływania się na jakiegokolwiek cytowania literatury źródłowej, a sama definicja zmienności genetycznej jako *„zmienności materiału genetycznego pomiędzy osobnikami”* (str. 2) wydaje się czystą tautologią. Z kolei stwierdzenie *„Każda z linii stanowi oddzielne zdarzenie transformacyjne, które poddawane było samozapyleniu...”* (str. 9) ma charakter ‘skrótów myślowego’. Na str. 17 Autorka pisze, że *„W linii T1 transgen włączony jest w nić opóźnioną...”*, a w linii T2 *„wstawiony jest w nić wiodącą”*, mając zapewne na myśli odpowiednio nić komplementarną do referencji i nić referencyjną. W całym opracowaniu Autorka podpisuje ryciny terminem ‘Figura’, co jest nieuprawnioną kalką z języka angielskiego.

Pomimo tej rozbudowanej części krytycznej w mojej recenzji, ogólnie pozytywnie oceniam merytoryczną treść przedstawionej dysertacji i uważam, że wnosi ona nowe wartości. Uzyskane wyniki nie są łatwe do jednoznacznej interpretacji. Moje uwagi mają charakter polemiczny, a ich celem jest wskazanie możliwości interpretacyjnych i kierunków dalszych działań. Należy podkreślić, że nakład pracy wymagany do realizacji postawionych sobie przez Autorkę celów badawczych był znaczący. Wysoko oceniam o przygotowanie Doktorantki do prowadzenia analiz bioinformatycznych w oparciu o dane z sekwencjonowania wysokowydajnego. Jej profesjonalizm w tym zakresie jest potwierdzony udziałem w licznych, jak na ten etap kariery naukowej w Polsce, publikacjach naukowych, które nie weszły w skład rozprawy doktorskiej (łącznie 23 publikacje w Web of Science, 97 cytowań i H=4).

Podsumowanie

Za najważniejsze osiągnięcia Pani mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej, będące wynikiem badań opisanych w rozprawie doktorskiej uważam: (1) określenie skali zmian na poziomie sekwencji DNA, powstających w toku kultur *in vitro* ogórka, (2) wykazanie, że liczba zmian zależy od czasu i typu kultury, (3) precyzyjną charakterystykę miejsc integracji transgenu w transgenicznym liniach ogórka, w oparciu o odczyty sekwencjonowania genomowego tych linii oraz (4) wykazanie, że transgeneza nie skutkuje zwiększeniem liczby zmian w kontekście całego genomu.

Stwierdzam, że oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz jej umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Wniosuję zatem o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Skarzyńskiej do dalszych etapów procedury doktoranckiej.

Kraków, 26 kwietnia 2022


prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus