

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Joanny Machczyńskiej
„Uwarunkowanie zmienności epigenetycznej i genetycznej indukowanej w kulturach *in vitro* u pszenżyta (*xTriticosecale* ssp. Wittmack ex. A. Camus)”

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Machczyńskiej została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Piotra Bednarka w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR-PIB) w Radzikowie. Promotorem pomocniczym rozprawy była Pani dr Renata Orłowska. Rozprawę stanowią trzy, spójne tematycznie artykuły, opublikowane w latach 2014-2015 w międzynarodowych czasopismach naukowych listy JCR: *Molecular Breeding*, *Plant Molecular Biology* i *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Sumaryczny pięcioletni współczynnik oddziaływania wymienionych wyżej czasopism (5 year Impact Factor; IF) wynosi 9,26, co odpowiada 105 punktom MNiSW. Wszystkie prace są wieloautorskie, mają od 3 do 5 autorów, a mgr Joanna Machczyńska jest pierwszym autorem każdej pracy. Do dokumentacji włączono oświadczenia współautorów artykułów, które jednoznacznie wskazują na dominującą rolę Doktorantki w przeprowadzeniu opisanych w nich badań i Jej znaczący udział w przygotowaniu publikacji do druku. Zestawienie tych prac tak, aby tworzyły rozprawę doktorską nie budzi moich żadnych wątpliwości, dotyczą one bowiem różnych aspektów oceny zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* pszenżyta (*xTriticosecale* ssp. Wittmack ex. A. Camus). W skład rozprawy, poza publikacjami, wchodzi następujące rozdziały: streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, przedstawienie celu badań, omówienie wyboru materiału i metod badawczych, omówienie wyników badań przedstawionych w poszczególnych publikacjach, podsumowanie uzyskanych wyników oraz obserwacje i wnioski.

Przedmiot rozprawy i jego naukowe znaczenie

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Machczyńskiej jest kompleksowa analiza zmian indukowanych podczas regeneracji roślin pszenżyta (*xTriticosecale* ssp. Wittmack ex. A. Camus) w różnych systemach kultur *in vitro*. Choć zmienność występująca u roślin uzyskanych z kultur *in vitro*, nazwana w 1981 przez jej pierwszych badaczy – Larkina i Scowcrofta ‘zmiennością somaklonalną’, stała się od tego czasu przedmiotem wielu badań i analiz, do dziś nie potrafimy jej w pełni kontrolować. Początkowo, zmienność towarzysząca procesom regeneracji roślin w kulturach *in vitro* traktowano jako nowe, użyteczne źródło zmienności genetycznej, szczególnie dla roślin rozmnażanych wegetatywnie. Stąd, w latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia pojawiło się wiele prac poświęconych badaniom genetycznym, cytologicznym i molekularnym podstaw tej zmienności, prowadzonych dla wielu gatunków roślin uprawnych. Jednym z odkryć, które przyniosły te badania było wykazanie, że oprócz zmian w sekwencjach DNA oraz strukturze i liczbie chromosomów, w warunkach kultury *in vitro* indukowane są zmiany o charakterze epigenetycznym, związane z metylacją DNA i zmianami w ekspresji genów. Zmienność somaklonalna jako źródło zmienności okazała się jednak mniej efektywna niż mutageneza chemiczna lub fizyczna, szczególnie, że techniki takie jak mutageneza insercyjna i TILLING

pozwalają na poszukiwanie mutacji w konkretnych genach, zaś najnowsza technologia CRISPR-Cas9 daje nawet możliwość kierunkowego indukowania zmian. Obecnie, główny nurt badań zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* dotyczy ustalenia molekularnych podstaw tego zjawiska oraz czynników, które wpływają na jego poziom. Pszenżyto należy do gatunków, dla których dotychczas nie prowadzono takich analiz, a przedstawiona rozprawa doktorska mgr Joanny Machczyńskiej stanowi nowy rozdział tych ważnych merytorycznie badań. Należy przy tym podkreślić, że zarówno zmiany genetyczne, jak i epigenetyczne u regenerantów z kultur *in vitro*, najczęściej nie są pożądane przez hodowców lub producentów roślin, a zmienność somaklonalna jest niekorzystnym zjawiskiem np. podczas otrzymywania podwojonych haploidów czy w mikropropagacji. Stąd, badania mgr Joanny Machczyńskiej mają także duże znaczenie praktyczne dla hodowców pszenżyta.

Szczegółowe cele rozprawy, obiekt badań i zastosowane metodyki badawcze

Głównym celem badań podjętych przez Doktorantkę była ocena poziomu genetycznej i epigenetycznej zmienności indukowanej w warunkach kultury *in vitro* pszenżyta (*xTriticosecale*). Pszenżyto, wybrane jako obiekt tych badań jest ważnym gatunkiem uprawnym, a Polska jest jednym z głównych producentów tego zboża w Europie. W swych badaniach mgr Joanna Machczyńska wykorzystwała linie podwojonych haploidów pszenżyta odmiany 'Bogo' jako rośliny donorowe dla kultur, co zapewniło pełną homozygotyczność materiału wyjściowego i umożliwiło wyeliminowanie ewentualnej zmienności w eksplantatach, jako źródła zmian obserwowanych u regenerantów. W badaniach zastosowano trzy systemy kultur *in vitro*: kultury pylnikowe, kultury mikrospor i kultury niedojrzałych zarodków zygotycznych. Dla oszacowania rodzaju i poziomu zmian indukowanych w kulturach zastosowano opracowaną w zespole Pana dr hab. Piotra Bednarka metodę metAFLP (*methylation sensitive amplified fragment length polymorphism*), która pozwala na jednoczesną analizę zmian w sekwencjach DNA oraz zmian o charakterze epigenetycznym, związanych z metylacją/demetylacją DNA. Należy w tym miejscu podkreślić, że Doktorantka rozwinęła twórczo wykorzystanie tej metody, proponując interpretację złożonych profili prążków u roślin donorowych i ich zregenerowanego w kulturach potomstwa, co było przedmiotem jednej z publikacji wchodzących w skład rozprawy. Pani mgr Machczyńska postawiła sobie także zadanie ilościowego określenia poziomu metylacji genomu roślin stanowiących materiał wyjściowy dla kultur, regenerantów oraz ich trzech pokoleń generatywnych. Dla realizacji tego zadania wykorzystwała technikę RP-HPLC (*reverse phase high performance liquid chromatography*), co pozwoliło jej także porównać efektywność metod metAFLP i RP-HPLC w wykrywaniu zmian w poziomie metylacji DNA. Zarówno dobór materiału badań, jak i zastosowanych metod badawczych, oceniam jako bardzo odpowiedni, co pozwoliło Doktorantce zrealizować założone cele.

Najważniejsze uzyskane wyniki

W rozprawie przedstawiono wyniki starannie zaplanowanych i opisanych analiz, a za najważniejsze z nich uważam:

1. Wykazanie, że warunki kultury *in vitro* indukują stosunkowo wysoki (ok. 30%) poziom zmian o charakterze genetycznym i epigenetycznym u regenerantów pszenżyta, niezależnie od zastosowanego systemu regeneracji (andogeneza lub somatyczna embriogeneza).
2. Stwierdzenie, że podstawową przyczyną obserwowanej zmienności są zmiany w sekwencjach DNA, natomiast zmiany we wzorach metylacji zachodzą z dwukrotnie niższą częstotliwością.
3. Wykazanie, że u regenerantów pszenżyta, w porównaniu do roślin donorowych, przeważają procesy demetylacji DNA, w stosunku do metylacji *de novo*.
4. Stwierdzenie, że zarówno genotyp rośliny donorowej, jak i zastosowana procedura regeneracji roślin wpływają na poziom i rodzaj zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* pszenżyta.

5. Wykazanie, że globalny poziom metylacji DNA u regenerantów jest niższy niż u roślin donorowych i zmiana ta utrzymuje się przez kilka generatywnych pokoleń regenerantów.
6. Opracowanie metody ilościowej analizy profili markerów metAFLP, która umożliwi dokładne scharakteryzowanie w jednym doświadczeniu zmian w DNA zachodzących w kulturze *in vitro*, w tym interpretację zmian o charakterze złożonym. Zaproponowana przez Doktorantkę metoda pozwala nie tylko na określenie częstotliwości zmian mutacyjnych oraz zdarzeń metylacji *de novo* i demetylacji DNA w sekwencjach restrykcyjnych dla zastosowanych w pracy enzymów *Acc65I* i *KpnI*, lecz także na ilościowe oszacowanie globalnego poziomu metylacji DNA oraz liczby miejsc niezmiennych podczas kultury *in vitro*.

Komentarze, pytania i uwagi krytyczne

Przedstawioną do recenzji pracę oceniam bardzo wysoko. Wywód poprowadzony jest logicznie, doświadczenia bardzo dobrze zaplanowane i wykonane. Całość jest celnie zinterpretowana. Nie mam żadnych większych zastrzeżeń do rozprawy, a postawione niżej pytania wynikają bardziej z mojej ciekawości i chęci przedyskutowania niektórych zagadnień na żywo, w trakcie obrony rozprawy doktorskiej. Jako że publikacje wchodzące w skład rozprawy, przed opublikowaniem w renomowanych czasopismach naukowych podlegały już wnikliwej analizie recenzentów i uzyskały ich pozytywne opinie, moje uwagi edytorskie dotyczą tylko pozostałych części rozprawy.

- Jak wytłumaczyć znacznie wyższy poziom zmienności w kulturze *in vitro* (w tym blisko 2x większą częstotliwość zmian sekwencyjnych) przedstawiony w pracy Machczyńska et al. 2015, *Plant Mol Biol.* 89: 279-292, w stosunku do wyników przedstawionych w pracy Machczyńska et al. 2014, *Mol Breeding?* W pierwszej pracy obserwowany średni poziom zmian sekwencyjnych u regenerantów wynosił 10%, natomiast w drugiej 19%, a opis materiału i metod wykorzystanych w obu pracach jest taki sam.
- Jakie mogły być podstawy molekularne obserwowanej zmienności sekwencji DNA? Jej poziom jest bardzo wysoki w stosunku do innych gatunków zbóż, np. jęczmienia badanego z zastosowaniem tego samego systemu (Bednarek et al. 2007, *BMC Plant Biology* 7:10). Jak można to wytłumaczyć?
- W trzeciej z prac stanowiących rozprawę doktorską badano, czy zmiany w poziomie metylacji DNA obserwowane u regenerantów transmitowane są do ich generatywnego potomstwa. Nie przedstawiono podobnych badań dla zmian indukowanych w sekwencjach DNA, mimo że stanowiły one przeważający typ zmienności. Czy Doktorantka uważa przeprowadzenie takich badań za istotne dla określenia poziomu zmienności somaklonalnej w kulturach *in vitro* pszenżyta?
- W skład rozprawy wchodzi przegląd literatury, w którym Doktorantka zawarła opis czynników wpływających na zmienność u regenerantów wyprowadzonych w kulturach *in vitro*. Brak jest w nim jednak logicznego uporządkowania. Przykładem może być. podrozdział 'Zaburzenia w procesach komórkowych,' w którym omawiane są mechanizmy prowadzące do zmian w sekwencjach mikrosatelitarnych, a następny podrozdział to 'Migracja czynników mobilnych i zmienność w sekwencjach powtórzonych tandemowo', co także dotyczy sekwencji mikrosatelitarnych. W podrozdziale 'Czynniki abiotyczne wywołujące stres u roślin' omówione są prace, które nie dotyczą kultur *in vitro*, np. Guzy-Wrobelska et al., 2013, brak natomiast bardzo obszernej literatury dotyczącej roli stresu (temperatura, głodzenie) w indukcji procesu androgenezy. Mam także zastrzeżenia do umieszczenia przez Autorkę zjawiska albinizmu w podrozdziale 'Zmiany w morfologii roślin', gdyż brak chlorofilu u części regenerantów zbóż jest tylko przejawem zmian w organizacji i ekspresji chloroplastowego DNA, co zresztą sama Doktorantka opisuje w tym podrozdziale. Generalnie, zmiany morfologiczne u regenerantów są tylko skutkiem innych zmian, zachodzących na poziomie molekularnym i tylko tak powinny być przedstawiane.

- Jeśli przegląd literatury byłby przygotowywany do druku jako publikacja przeglądowa w języku polskim, mam zastrzeżenia do kilku terminów, których przykłady podaję poniżej: ‘zmienność swoista’ (ang. pre-existing variation, a więc raczej zmienność obecna w roślinie donorowej lub eksplantacie), ‘migracja mobilnych elementów’ (elementy mobilne ulegają transpozycji lub w przypadku retroelementów insercji w nowe miejsce w genomie), ‘mutacje losowe’ (poza ukierunkowaną mutagenezą, wszystkie mutacje mają charakter losowy). ‘gatunki hodowane przez krzyżowanie wsobne’ (o jakie gatunki chodzi?), rośliny chimeryczne (chyba rośliny chimeralne).

Powyższe uwagi krytyczne i komentarze dotyczą kwestii stosunkowo drobnych, przede wszystkim edycyjnych i nie wpływają na moją wysoką opinię o merytorycznej wartości rozprawy mgr Joanny Machczyńskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, pragnę stwierdzić, że rozprawa Pani mgr Joanny Machczyńskiej spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury naukowej dotyczącej problematyki jej badań, umiejętnością stawiania hipotez naukowych, planowania eksperymentów i stosowania właściwych metod badawczych. Przedstawione badania reprezentują wysoki poziom naukowy i wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat mechanizmów zmienności genetycznej i epigenetycznej indukowanej w kulturach *in vitro* roślin. Otrzymane wyniki są oryginalne i zawierają oczywisty element nowości naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Joanny Machczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sformułowana powyżej ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Machczyńskiej, a także fakt, że wyniki Jej badań zostały już opublikowane w renomowanych czasopismach międzynarodowych, upoważniają mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie tej rozprawy.

Prof. dr hab. Iwona Szarejko