

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Joanny Machczyńskiej

pt. *Uwarunkowanie zmienności epigenetycznej i genetycznej indukowanej w kulturach in vitro u pszenżyta* (*× Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus)

W przedstawionej mi do recenzji pracy Autorka badała poziom metylacji cytozyny w genomie pszenżyta oraz podjęła próbę ilościowej charakterystyki zmian genetycznych i epigenetycznych podczas androgenozy i embriogenezy somatycznej w kolejnych pokoleniach regenerantów. Wykorzystała w tym celu modyfikację metody AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), nazwaną metAFLP, pozwalającą na równoległą identyfikację polimorfizmów DNA wynikających z substytucji nukleotydowych w obrębie miejsc trawienia restrykcyjnego, jak również zmian wynikających z metylacji cytozyny w tych samych miejscach. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu dwóch bibliotek fragmentów restrykcyjnych uzyskanych dla tych samych roślin przy wykorzystaniu izoschizomerów restryktaz (*KpnI/Acc65I*) o różnej wrażliwości na metylację cytozyny. Wyniki odniesiono do rezultatów ilościowej oceny globalnej metylacji genomu pszenżyta metodą RP-HPLC. Przedstawione wyniki mają znaczenie poznawcze, mogą również pozwolić na bardziej efektywne wykorzystanie procesów androgenozy i embriogenezy somatycznej w doskonaleniu genetycznym i pracach hodowlanych u pszenżyta.

Struktura pracy

Zasadniczą część dysertacji stanowią trzy artykuły naukowe w języku angielskim, opublikowane w latach 2014-2015 w czasopismach naukowych o wysokiej renomie w dziedzinie nauk o roślinach, t.j. *Molecular Breeding* (IF₂₀₁₄=2,246), *Plant Molecular Biology* (IF₂₀₁₄=4,257) oraz *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (IF₂₀₁₄=2,125). Zostały one uzupełnione o ogólne streszczenia w języku polskim i angielskim; 'przeгляд literatury', czyli opis aktualnego stanu wiedzy obejmujący 21 stron maszynopisu; cele badań, analizowane hipotezy badawcze oraz opis materiałów roślinnych i metod wykorzystanych w badaniach; syntetyczne, kilkustronicowe podsumowania każdego z artykułów w języku polskim; ogólne podsumowanie; 13 punktów obejmujących najważniejsze obserwacje i wnioski wpływające z przeprowadzonych

eksperymentów; obszerny 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.

Przeгляд literatury jest poprawnie skonstruowany i stanowi syntetyczny opis wiedzy związanej z podjętym przez Autorkę problemem, dobrze wprowadzając w tematykę badawczą realizowaną w pracy doktorskiej. Autorka przedstawiła znaczenie podwojonych haploidów w hodowli roślin, omówiła metody ich otrzymywania, scharakteryzowała czynniki indukujące zmienność w kulturach *in vitro*, opisała metody analiz molekularnych wykorzystywane do badań nad tą zmiennością, wreszcie odniosła te kwestie do pszenżyta, czyli gatunku stanowiącego przedmiot analiz opisanych w dysertacji.

Cel pracy został zdefiniowany w postaci pięciu jasno sformułowanych punktów i obejmował opracowanie metodyki (rozszerzony wariant metAFLP), jej wykorzystanie do jakościowej i ilościowej oceny zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* pszenżyta, ocenę wpływu genotypu oraz systemu regeneracji na poziom tej zmienności, a także ocenę globalnego poziomu metylacji metodami metAFLP i RP-HPLC oraz ich porównanie. Sformułowane przez Autorkę hipotezy badawcze można zasadniczo uznać za już wcześniej zweryfikowane przez inne zespoły badawcze, natomiast brakowało dotąd ich sprawdzenia u pszenżyta, co spełnia wymóg nowości naukowej przedstawionej mi do recenzji rozprawy. Krótka charakterystyka materiałów roślinnych i metod pozwoliła podkreślić znaczenie przykładane przez Autorkę do jednorodności genetycznej roślin wyjściowych i przydatność metody metAFLP.

W obejmującym jedną stronę podsumowaniu wyników syntetycznie przedstawiono najważniejsze osiągnięcia, rozdział ten przedstawia kluczowe informacje (*key message*) w kontekście całości rozprawy.

Obserwacje i wnioski to zbiór trzynastu punktów odnoszących się bezpośrednio do przeprowadzonych eksperymentów i stanowiący ich podsumowanie. Wydaje mi się, że ta część mogłaby być nieco bardziej przemyślana, oczekiwałbym sformułowania mniejszej liczby bardziej podstawowych wniosków, na podstawie uzyskanych wyników i ich dyskusji oraz eliminacji 'obserwacji'. Do kwestii merytorycznych odniosę się później.

Spis literatury obejmuje 216 pozycji, w tym 41 publikacji naukowych z ostatnich pięciu lat.

Oświadczenia Autorów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że udział Pani mgr Joanny Machczyńskiej w realizacji wszystkich trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy był bardzo 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

Praca przedstawia interesujące wyniki eksperymentów dotyczących identyfikacji zmian genetycznych oraz zmian globalnego poziomu metylacji DNA indukowanych w kulturach *in vitro* pszenżyta. Wykorzystana w celu ich identyfikacji metoda metAFLP jest modyfikacją techniki AFLP opracowaną przez zespół pod kierunkiem dr hab. Piotra Bednarka, promotora niniejszej dysertacji. Najważniejszymi, moim zdaniem, osiągnięciami wynikającymi z opisanych badań było (1) stwierdzenie, że u pszenżyta zmiany genetyczne obejmujące substytucje nukleotydowe i rearanżacje, były częstsze niż zmiany profilu metylacji; (2) stwierdzenie, że kultury *in vitro* pszenżyta skutkują częściową demetylacją genomu, a w kolejnych pokoleniach regenerantów obserwuje się stopniowy wzrost poziomu metylacji; (3) poziom zmian genetycznych i epigenetycznych jest prawdopodobnie przynajmniej w pewnym stopniu zależny od genotypu rośliny donorowej; (4) prawdopodobnie istnieją różnice poziomu indukcji zmienności zależnie od typu kultury (androgeneza vs. somatyczna embriogeneza).

W przeglądzie literatury, mimo jego właściwej struktury, znalazłem szereg mniejszych lub większych niedoskonałości, które należałoby skorygować. Wynikają one zapewne z próby syntetycznego opisu związanego z koniecznością ograniczenia objętości tej części dysertacji. Brakuje mi zwłaszcza nawet krótkiego odniesienia się do różnych kontekstów metylacji cytozyny (CG, CNG, CNN). Jak wiadomo kontekst determinuje ten determinuje funkcję. Brakuje również informacji na temat molekularnych mechanizmów warunkujących metylację genomu u roślin, które w ostatnich latach zostały przynajmniej częściowo rozpoznane.

W pewnych miejscach przeglądu literatury obecne są skróty myślowe i niejasności. Na stronie 4 opis androgenezy wymagałby gruntownego przerehabilitowania; terminy takie jak: 'gameta', 'mikrospora' powinny być używane we właściwym, precyzyjnie określonym kontekście. Na stronie 6 Autorka wymienia czynniki wpływające na zmienność u regenerantów – uważam, że należałoby je uporządkować: genotyp roślin donorowych, rodzaj eksplantatu,

metoda otrzymywania regenerantów, skład pożywek i czas trwania kultury (dwa ostatnie później zaliczone do czynników abiotycznych, str. 11), to czynniki, które zależą od decyzji eksperymentatora, natomiast zaburzenia w procesach komórkowych, migracja elementów ruchomych i zmienność sekwencji powtórzonych tandemowo to efekty oddziaływań tych wymienionych powyżej czynników, podobnie jak nieujęte w tym zestawieniu substytucje nukleotydowe czy zmiany metylacji. Ważna jest też precyzyjna definicja każdego z tych czynników, np. o wpływie eksplantatu możemy mówić wtedy, kiedy nie jesteśmy w stanie przypisać tego efektu do żadnego bardziej precyzyjnie zdefiniowanego zjawiska, dlatego jeśli mówimy o wpływie ploidalności (str. 8), nie należy go umieszczać w szerszej kategorii wpływu eksplantatu. *Non-homologous end joining* (NHEJ) to nie rekombinacja niehomologiczna (str. 10).

Mam również pewne wątpliwości dotyczące sformułowania wniosków. Wniosek 4 wydaje mi się wewnętrznie sprzeczny („Analiza statystyczna regenerantów na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej nie ujawniła różnic [...] Uzyskany wynik świadczy o tym, że systemy regeneracji roślin wpływają na poziom badanych zmian”), podobnie wniosek 10 („Mimo zbieżnych wyników metAFLP i RP-HPLC zaobserwowano ich słabą korelację [...]"). Wnioski 7 i 8 mają charakter deklaratywny i są bardzo ogólne („[...] charakterystyki metAFLP odzwierciedlają różne aspekty zjawisk zachodzących podczas regeneracji [...]", „[...] metAFLP pozwala na szczegółową analizę wybranych zjawisk genetycznych i epigenetycznych [...]"). Uważam, że ograniczenie liczby sformułowanych wniosków do tych kilku najważniejszych i jednoznacznie udokumentowanych poprawiłoby podstawowy przekaz pracy – chcę jednak zaznaczyć, że rolę tę dobrze spełnił rozdział pt. Podsumowanie uzyskanych wyników.


Podsumowanie

Przedstawioną mi do oceny pracę, mimo wskazanych powyżej punktów do dyskusji, oceniam wysoko. Wskazuje ona na dobry poziom merytorycznego przygotowania Autorki do prowadzenia badań z zakresu molekularnej analizy zmienności genetycznej i epigenetycznej u roślin. Podjęta przez Autorkę tematyka posiada duże znaczenie poznawcze, a jednocześnie pewien potencjał aplikacyjny w kierunku wspomagania prac hodowlanych pszenżyta.

Oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną

Pani mgr. Joanny Machczyńskiej w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie agronomii oraz jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytut Badawczy w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr Joanny Machczyńskiej do dalszych etapów procedury doktoranckiej. Jednocześnie z uwagi na fakt, że podstawę rozprawy stanowią publikacje o relatywnie wysokim sumarycznym współczynniku wpływu ($IF=8,628$) stawiam wniosek o wyróżnienie pracy.

Kraków, 27 kwietnia 2016


prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus