

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 5 marca 2022r.

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Puchta-Jasińskiej pt.
„Transkryptomocznica charakterystyka procesu starzenia się nasion
Hordeum vulgare L.”**

Wprowadzenie

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z najważniejszych gatunków uprawnych. Należy do gatunków roślin wczesnie udomowionych przez człowieka i towarzyszących rolnictwu od czasów starożytnych. W obrębie gatunku zidentyfikowano szereg odmian różnego typu i zgromadzono bogate zasoby genowe w Bankach Genów. Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska dotyczy procesu starzenia nasion jęczmienia. Autorka w swym podejściu badawczym zastosowała zaawansowane metody transkryptomocznice, co pozwoliło jej zbadać ten proces na poziomie molekularnym. Poznanie zmian zachodzących podczas starzenia nasion na poziomie molekularnym jest ważne i umożliwia nie tylko lepsze poznanie biologii nasion, ale także rozwój nowych metod badania żywotności nasion i sposobów ich przechowywania, szczególnie przydatnych w działalności Banków Genów. Tematyka pracy jest oryginalna i nowatorska. Praca została wykonana w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych działającym w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym (IHAR-PIB) w Radzikowie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. Maja Boczkowska, prof. IHAR-PIB, zaś promotorem pomocniczym jest Pani dr Jolanta Groszyk.

Dane formalne o rozprawie

Praca doktorska Pani mgr inż. Marty Puchta-Jasińskiej ma układ klasyczny, typowy dla prac doktorskich i liczy 208 stron. Praca zawiera następujące rozdziały: cele badań i hipotezy badawcze (1 strona), przegląd literatury (30 stron), materiały i metody (33 strony), wyniki (78 stron), dyskusja (23 stron), podsumowanie i wnioski (2 strony) i spis literatury. W rozprawie zamieszczono 83 rysunki i 43 tabele, załączono także ich spis. W treści pracy Autorka odwołała

się do 317 pozycji literatury źródłowej. Są to głównie artykuły naukowe w języku angielskim, ale także rozdziały z monografii i odwołania do portali internetowych. Pracy towarzyszy pięć suplementów w postaci tabel i schematów oraz osiem suplementów elektronicznych, zawierających przede wszystkim szczegółowe wyniki analiz bioinformatycznych i dane sekwencyjne. Rozprawę poprzedza szczegółowy spis treści i wykaz skrótów, a ponadto uzupełniają ją streszczenia w języku polskim i angielskim oraz informacja o tym, że część wyników pracy została opublikowana w trzech publikacjach. Układ pracy jest kompletny i przejrzysty. Mam jedną uwagę dotyczącą struktury pracy. Myślę, że rozdział zawierający cele badań i hipotezy badawcze mógłby być zamieszczony po przeglądzie literatury, a nie na początku pracy, wówczas czytający byłby lepiej wprowadzony w tematykę rozprawy i dobrze przygotowany do zapoznania się z tym rozdziałem.

Ocena rozprawy

W pierwszym rozdziale pracy Autorka przedstawiła cele badań i hipotezy badawcze. Autorka podjęła się bardzo trudnego zadania, którym było poznanie mikrotranskryptomu i degradomu oraz transkryptomu części zarodkowych nasion pochodzących z długoterminowego przechowywania i różniących się zdolnością do kiełkowania. Autorka przedstawiła sześć szczegółowych celów pracy i postawiła pięć hipotez badawczych. Uważam, że cele pracy zostały jasno sformułowane, a hipotezy badawcze są przemyślane.

Część doświadczalną pracy poprzedza przegląd literatury, w którym Autorka opisała udomowienie i aktualną produkcję jęczmienia zwyczajnego na świecie oraz przedstawiła znaczenie ochrony bioróżnorodności roślin. Następnie Autorka szczegółowo omówiła zmiany zachodzące w nasionach podczas starzenia na poziomie komórkowym, biochemicznym i molekularnym, a także opisała biogenezę małych niekodujących RNA u roślin uwzględniając udział miRNA w kiełkowaniu nasion. W ostatnim akapicie tego podrozdziału Autorka wskazała, że podczas kiełkowania nasion miRNA może regulować geny kodujące białka zawierające powtórzenia pentatrikopeptydowe (PPR). Zabrakło mi tutaj informacji o tym, że białka te wiążą się w sekwencyjnie specyficzny sposób z cząsteczkami RNA, przez co bezpośrednio wpływają na ich funkcje. Zakres przeglądu literatury jest szeroki. W moim odczuciu niektóre fragmenty omawiające zjawiska podstawowe mogłyby być skrócone, co nie umniejszyłoby wartości merytorycznej pracy.

W kolejnym rozdziale Autorka omówiła wykorzystane materiały i zastosowane metody. Realizacja celów pracy i weryfikacja postawionych hipotez badawczych były możliwe dzięki dostępności unikalnego materiału biologicznego. Wykorzystano próby ziarniaków jęczmienia odmiany Damazy, przechowywane w próżni przez 42 lata i różniące się zdolnością do kiełkowania. Jako kontrolę wykorzystano ziarniaki z niedawnego rozmnożenia tej samej odmiany. Tak więc tło genetyczne prób nasion wykorzystanych w analizach było jednolite, co jest dużą zaletą wykorzystanego materiału badawczego. Z ziarniaków pozyskiwano część zarodkową, z której izolowano RNA na potrzeby analiz transkryptomocnych.

Analizy transkryptomocne zostały dobrze zaplanowane. Autorka konstruowała biblioteki do sekwencjonowania oddzielnie dla różnych frakcji RNA w trzech powtórzeniach biologicznych. Należy podkreślić, że konstruowanie bibliotek RNA do sekwencjonowania metodą Illumina jest złożone technicznie i wymaga dużej wprawy laboratoryjnej. Szereg elementów proceduralnych wymagało optymalizacji, począwszy od izolacji RNA z części zarodkowej wysuszonych ziarniaków. Na potrzeby analizy degradomu Autorka opracowała własną metodykę, zaś w przypadku analizy RNA-seq napotkała problemy z jakością RNA, które rozwiązała wypracowując własne podejście metodyczne. Sekwencjonowanie bibliotek miRNA-Seq i degradome-Seq zostało wykonane z wykorzystaniem sekwenatora Illumina MiSeq w własnym laboratorium, zaś RNA-seq usługowo, z wykorzystaniem sekwenatora HiSeq4000, który lepiej nadaje się do tych analiz. Analizy bioinformatyczne i statystyczne zostały wykonane z wykorzystaniem ogólnie dostępnych narzędzi bioinformatycznych i baz danych. Aby zweryfikować wyniki analiz bioinformatycznych Autorka zastosowała dla wybranych genów metodę RT-qPCR, która jest stosowana rutynowo w tym celu.

Poszczególne metody zostały przez Autorkę właściwie opisane. Stosowane odczynniki i sprzęt laboratoryjny zestawiono w postaci tabelarycznej. Trochę szkoda, że nie wydzielono podrozdziału ze stosowanymi pożywkami i buforami, co poprawiłoby czytelność i spójność tego rozdziału. Niezależnie od tej uwagi, uważam że jest to bardzo wartościowy rozdział pracy, a opisy metodyki konstruowania bibliotek są szczególnie cenne dla doktorantów i badaczy, którzy planują wykorzystanie metod transkryptomocnych w swoich pracach.

W następnym rozdziale pracy Autorka przedstawiła uzyskane wyniki. Jest to najobszerniejszy rozdział pracy. Przedstawione wyniki są dobrze udokumentowane, chociaż uważam, że dokumentacja ta mogłaby być przedstawiona w sposób bardziej syntetyczny. Do

najważniejszych wyników Autorki należy wykazanie dużej stabilności miRNA podczas długoterminowego przechowywania nasion. Jest to niezmiernie ciekawy wynik i warty dalszego zbadania ponieważ mechanizmy stabilizacji i degradacji RNA budzą duże zainteresowanie naukowców oraz znajdują zastosowanie praktyczne. W następstwie analizy miRNA-Seq Autorka zidentyfikowała i sklasyfikowała miRNA występujące w części zarodkowej nasion jęczmienia, łącznie 61 znanych i 81 nowych miRNA, przy czym dla wielu miRNA zidentyfikowała i scharakteryzowała szereg izoform (tak zwane izomiry), które różniły się długością. Dla wybranych miRNA poziom ekspresji został potwierdzony metodą RT-qPCR i wskazano miRNA różnicujące badane próby nasion.

Aby wskazać geny regulowane przez zidentyfikowane miRNA Autorka wykonała analizę *in silico*, wykorzystując dostępne dane genomiczne dla jęczmienia, a jednocześnie analizę produktów degradacji mRNA stosując metodę degradome-Seq. Takie dwutorowe podejście umożliwiło porównanie tych metod i wskazanie transkryptów regulowanych przez miRNA. Następnie Autorka przypisała tym transkryptom kategorie funkcjonalne wykorzystując podejście oparte o ontologię genów (Gene Ontology) i wskazała szereg procesów i funkcji biologicznych różnicujących badane materiały. Jednym z ciekawszych wyników jest wskazanie, że nowy miRNA Hvu-new41 może regulować ekspresję 1-3,1-4- β -D-glukanazy, enzymu depolimeryzującego glukany. Autorka postuluje, że obniżenie ekspresji tego genu może ograniczać zdolność do kiełkowania nasion.

W ostatniej części tego rozdziału, Autorka przedstawiła wyniki analizy RNA-seq i wskazała transkrypty różnicujące trzy typy nasion o różnej żywotności. W analizie bioinformatycznej danych RNA-seq wykorzystano dwa podejścia - w pierwszym odczyty sekwencyjne mapowano na genomie referencyjnym jęczmienia, zaś w drugim wykonano złożenie transkryptomu *de novo* i wykorzystano je do mapowania odczytów sekwencyjnych. Autorka uznała, że to pierwsze podejście jest bardziej informatywne, pomimo tego, że genom referencyjny jęczmienia posiada pewne niedoskonałości. Aby scharakteryzować funkcje genów różnicujących badane próby Autorka wykorzystano wcześniej stosowane podejście bioinformatyczne oparte o katalogi grup ontologicznych (analiza GO) i przypisała różnicującym transkryptom kategorie ontologiczne i funkcje. Uzyskane wyniki potwierdziły między innymi znaczenie zachowania aktywności rybosomów i zdolności do translacji, metylacji DNA i alternatywnego splicingu, fosforylacji białek, metabolizmu cysteiny i kwasu askorbinowego w

zachowaniu zdolności nasion do kiełkowania. Do ważnych wyników należy powiązanie genu *Sip1* kodującego α -galaktozydazę związaną z imbibicją nasion z próbą nasion długoterminowo przechowywanych o niskiej żywotności. Ten wynik potwierdza stwierdzenie Autorki, że w próbie tej podczas przechowywania nastąpiła inicjacja kiełkowania, ale do wykiełkowania nasion nie doszło. Autorka postuluje, że zapoczątkowanie kiełkowania mogło skutkować degradacją transkryptów niezbędnych do kiełkowania i utratą żywotności nasion. Dysponując złożeniem transkryptomu *de novo* Autorka ponownie przeanalizowała dane degradomowe weryfikując wcześniej uzyskane wyniki.

Uważam, że Autorka uzyskała oryginalne wyniki, a szereg tych wyników stanowi dobry punkt wyjścia do dalszych badań. Warto byłoby poszerzyć analizy funkcjonalne, zarówno bioinformatyczne jak i eksperymentalne dla najbardziej interesujących miRNA i transkryptów. W dalszej perspektywie można byłoby zbadać długie niekodujące RNA i koliste RNA (lncRNA i circRNA), wówczas obraz różnic transkryptomocnych dla badanych materiałów byłby pełny, obejmowałby wszystkie typy RNA, a to pozwoliłoby na poszukiwanie kolejnych interakcji pomiędzy różnymi typami RNA.

Dyskusja jest napisana w sposób usystematyzowany i jest oparta na dużej liczbie publikacji naukowych. Autorka przedyskutowała uzyskane wyniki odnosząc się do prac innych zespołów wykonanych głównie dla zbóż i *Arabidopsis*, ale niekiedy odwołując się także do prac nad zwierzętami, szczególnie w zakresie wyników dotyczących miRNA. W dyskusji Autorka przedstawiła szereg przemyśleń i hipotez, które mogą być podstawą do dalszych badań.

Na zakończenie pracy Autorka sformułowała wnioski. Wnioski mają w większości charakter biologiczny, są również wnioski o charakterze metodycznym, które pozwolą na bardziej efektywne stosowanie metod transkryptomocnych w badaniach nad biologią nasion. Myślę, że niektóre wnioski mogłyby być lepiej sformułowane. Przykładowo wnioski 8 i 11 dotyczące utraty zdolności do kiełkowania podczas długoterminowego przechowywania nasion mogłyby być połączone razem.

Podsumowując, Autorka pracy pokazała, że potrafi formułować hipotezy badawcze oraz planować i wykonywać doświadczenia na potrzeby ich weryfikacji. Autorka świetnie opanowała metodykę konstruowania bibliotek i wysokoprzepustowego sekwencjonowania oraz analiz dużych zbiorów danych transkryptomocnych. Pokazała, że potrafi opracowywać i

krytyczne dyskutować wyniki własnych badań. Należy dodać, że większość wyników pracy została opublikowana w postaci dwóch artykułów w pismach o zasięgu międzynarodowym i pracy przeglądowej, co pokazuje, że Autorka potrafi skutecznie publikować.

Pytania i uwagi dotyczące pracy

Po przeczytaniu rozprawy nasunęło mi się kilka pytań i uwag dotyczących wykonanej pracy.

1. W pracy określano względny poziom ekspresji miRNA w oparciu o dane sekwencyjne i wykorzystywano metodę RT-qPCR. Jestem ciekawy na ile uzyskane wyniki były zgodne i jeżeli występowały różnice to z czego one mogły wynikać.
2. Autorka wskazuje znaczenie interakcji nasion z patogenami grzybami jako ważne dla zachowania ich żywotności. Czy w uzyskanych zbiorach danych sekwencyjnych odnotowano występowanie sekwencji typowych dla grzybów lub bakterii?
3. Czy na bazie uzyskanych wyników można byłoby zaproponować metodę diagnostyczną opartą o izolację RNA z suchych nasion i RT-qPCR, która umożliwiłaby szacowanie zdolności kiełkowania nasion pochodzących z przechowalni bez robienia klasycznych testów kiełkowania? Czy znane są takie metody dla innych gatunków?

W pracy dopatrzyłem się pewnych niedociągnięć edytorsko-redakcyjnych i stylistycznych, które nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, ale utrudniają czytanie rozprawy i z obowiązku recenzenta pozwalam sobie je wskazać:

1. Autorka często stosuje spolszczone słowa zapożyczone z języka angielskiego. Jest to częsty problem w pracach dotyczących genetyki i genomiki, gdyż słownik języka polskiego nie nadąza za postępem tych nauk. Myślę, że Autorka mogła trochę lepiej zadbać o wprowadzanie takich terminów do tekstu pracy poprzez ich odpowiednie definiowanie.
2. Autorka stosuje w pracy termin „egzon”. Ze względu na pochodzenie tego słowa od określenia „ekspresja” bardziej uzasadnione byłoby zatem stosowanie terminu „ekson”.
3. Podrozdziały dotyczące wyników analiz bioinformatycznych trudno się czyta, ze względu na duże nagromadzenie złożonych nazw genów i symboli kategorii funkcjonalnych. Myślę, że rozdziały te mogłyby być bardziej syntetyczne, a część mniej ważnych rysunków i tabel dokumentujących uzyskane wyniki przeniesiona do suplementów.
4. Niektóre odwołania do rysunków podane w tekście pracy są niewłaściwe. Przykładowo w podrozdziale 3.5 powinny być odwołania do rysunków 71-73, a są podane odwołania do rysunków 70-72.

5. Zamieszczone spisy literatury oraz tabel i rysunków zawierają niedociągnięcia edytorskie. Spis literatury nie jest do końca jednolity pod względem stylistycznym. Przykładowo: czasami podawane są imiona autorów, a innym razem tylko inicjały; publikacja Ratajczak i in (2019) pt. "Mitochondria are important determinants of the ageing of seeds" jest wymieniona w spisie dwukrotnie; w spisie rysunków i tabel w opisie tabeli 36 ujawnił się błąd edytorski związany z odwołaniem do tekstu pracy.
6. Niektóre sformułowania w tekście lub opisy rysunków są nieprecyzyjne lub mylące, przykładowo:
- strona 26 wiersz 10: sformułowanie „aktywność genów kodujących działanie ligazy” jest niezręczne, powinno raczej być „aktywność genów kodujących ligazy”,
 - rysunek 3: na schemacie błędnie opisano ścieżkę inhibicji translacji przez miRNA – podano inhibicja transkrypcji, a chodzi o inhibicję translacji,
 - rysunki 4 i 7: w opisie rysunków nie objaśniono skrótów opisujących badane próby, nie podano, co oznaczają skróty literowe Rc, Hv i Lv.

Wniosek końcowy

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr Marty Puchta-Jasińskiej oceniam bardzo pozytywnie. Praca jest oryginalna i zawarto w niej szereg ciekawych i wartościowych informacji. Autorka dobrze opanowała i wykorzystała metodykę analiz transkryptomicznych na potrzeby realizacji swych badań. Cele pracy zostały osiągnięte, a wyniki końcowe pracy nie budzą moich zastrzeżeń. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, określone w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 poz. 1789), zgodnie z art.179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 poz. 1669) z późn.zm. i rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z 20 września 2018 r. w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych (Dz. U. z 2018 poz. 1818) i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski