

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Puchta-Jasińskiej

pt. „Transkryptomocznna charakterystyka procesu starzenia się
nasion *Hordeum vulgare* L.”

praca doktorska zastała wykonana pod kierunkiem naukowym dr hab. Mai Karoliny
Boczkowskiej, prof. IHAR-PIB i promotora pomocniczego dr Jolanty Groszyk

1. Podstawa opracowania

Podstawę opracowania recenzji pracy doktorskiej stanowi pismo Pana prof. dr hab. Marka Stefana Szyndel, Przewodniczącego Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie z dnia 16.12.2022 r. oraz dołączona rozprawa doktorska Pani mgr Marty Puchta-Jasińskiej pt: *Transkryptomocznna charakterystyka procesu starzenia się nasion Hordeum vulgare* L. Praca została wykonana w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie.

2. Ocena merytoryczna

2.1. Trafność podjętej tematyki badawczej

W ostatnich latach duże zainteresowanie naukowe budzą badania naukowe poświęcone starzeniu się organizmów żywych. Starzeją się zarówno zwierzęta jak i rośliny. Prawidłowa ocena zmian zachodzących podczas starzenia się nasion na poziomie fizjologiczno-biochemicznym pozwala poznać mechanizm starzenia jak również wytypować procesy mogące go spowolnić. Dotychczasowy główny nurt badań naukowych dotyczy identyfikacji zmian zachodzących w kwasach nukleinowych, białkach i metabolitach podczas spoczynku nasion. Pomimo postępu jaki uzyskano w tych badaniach nadal nie poznano istoty procesu starzenia się nasion. W pracy przeprowadzono ocenę długoterminowego przechowywania i zmian zachodzących w starzejących się nasionach jęczmienia w obrębie mikrotranskryptomu i transkryptomu oraz integralności frakcji RNA w nasionach o różnym stopniu żywotności. Zidentyfikowano różnice w transkryptomie i mikrotranskryptomie nasion o różnej żywotności, zidentyfikowano geny powiązane z miRNA oraz dokonano identyfikacji

tkankowo - specyficznych miRNA. Przedłożona zatem do recenzji praca wpisuje się w najnowocześniejszy nurt badań procesu starzenia.

2.2. Ocena uzyskanych rezultatów i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Starzenie się nasion skutkujące obniżeniem wigoru i żywotność nasion jest zasadniczym problemem banków nasion. Oceniono zatem zmiany zachodzące w obrębie transkryptomu podczas starzenia się nasion. Największą liczbę transkryptów wykazano w ziarniakach zregenerowanych, najmniejszą natomiast w ziarniakach długo przechowywanych, o niskiej żywotności. Określono również różnice w poziomie ekspresji genów i funkcje transkryptów. Uważam, że przedstawione wyniki przyczynią się do wyjaśnienia przyczyn starzenia się ziarniaków jęczmienia.

3. Ocena merytoryczna i formalna

Recenzowana praca ma formę opracowania monograficznego, zaś treść pracy podzielona została w sposób standardowy. Przedstawiona do oceny praca liczy 207 stron na których oprócz tekstu znajduje się 85 rysunków i schematów oraz 43 tabele. Zawartość rozprawy doktorskiej obejmuje: Spis treści, Streszczenie i Abstract, Wykaz skrótów, Cel pracy i hipotezy badawcze, Przegląd literatury, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie i wnioski, Wykaz literatury, Spis rysunków i tabel oraz Załączniki. Praca zredagowana jest bardzo starannie, język i styl są poprawne, nie ma błędów gramatycznych zaś drobne błędy literowe czy interpunkcyjne są nieistotne. Przegląd literatury liczy 28 stron. Po krótkim opisie gatunku, przedstawiono znaczenie ochrony różnorodności biologicznej, żywotność i starzenie nasion oraz charakterystykę niekodującego RNA. Wstęp jak i cała praca bogata jest w perfekcyjnie wykonane schematy ułatwiające śledzenie toku myślenia Autorki. Przed wprowadzeniem do literatury przedmiotu na stronie 5 przedstawiono w sposób jasny i logiczny cel pracy oraz hipotezy badawcze. Cel badań zawiera sześć zadań cząstkowych obejmujących:

1. Ocena wpływu długoterminowego przechowywania i zmian zachodzących w starzejących się nasionach jęczmienia w obrębie mikrotranskryptomu i transkryptomu
2. Ocena integralności frakcji RNA w nasionach jęczmienia o różnym stopniu żywotności poddanych długotrwałemu przechowywaniu

3. Identyfikacja różnic w transkryptomie i mikrotranskryptomie nasion jęczmienia w różnym wieku oraz o różnym poziomie żywotności
4. Identyfikacja genów docelowych powiązanych z miRNA i ich funkcji, metodami *in silico* i eksperymentalnymi
5. Identyfikacja tkankowo - specyficznych miRNA
6. Identyfikacja funkcji transkryptów różnicujących próby nasion o różnym poziomie żywotności

Materiał i metody są prawidłowo i logicznie omówione. Na szczególne podkreślenie zasługuje unikalny materiał wykorzystany w badaniach, ziarniaki jęczmienia przechowywane przez 42 lata odm. Damazy. Do badań wytypowano ziarniaki o wysokiej żywotności na poziomie 83,3% i wilgotności 3,58% oraz niskiej żywotności 2% i wilgotności 12,5%. Ponadto szczegółowo omówiono optymalizację, izolację oraz analizy RNA. W pracy uzyskano bardzo bogaty materiał informacyjny. Autorka w przemyślany sposób usystematyzowała otrzymane wyniki i przedstawiła je niezwykle interesująco. Szczególne moje uznanie budzi analiza funkcjonalna transkryptów. Uzyskane wyniki Autorka trafnie przedstawiła i rzetelnie omówiła w poszczególnych rozdziałach pracy. Dyskusja pracy jest adekwatna do osiągniętych wyników oraz właściwie odnosi się do literatury tematu. Nie mam uwag krytycznych. Do bardzo silnych stron pracy doktorskiej należy zaawansowany poziom metodologiczny, doskonale przeprowadzone i opisane badania, starannie i na bardzo wysokim poziomie edycyjnym opracowane wyniki. Do najważniejszych osiągnięć stanowiących istotny postęp wiedzy należy uznać, wykazanie, że miRNA jest stabilną frakcją w nasionach niezależnie od żywotności i czasu przechowywania nasion. Ponadto wykazano w suchych nasionach 61 znanych i 81 nowych miRNA, zaś najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w czterech konserwatywnych rodzinach miRNA, tj. miR159, miR156, miR166 i miR168. Analiza RNA-Seq wykazała, że nasiona o wysokiej żywotności mają najwięcej rodzajów transkryptów związanych z procesami metabolizmu węglowodanowego, transkrypcją i translacją oraz biogenezą rybosomów.

Autorka jest bardzo dobrze zaznajomiona z literaturą przedmiotu, na co wskazuje bardzo obszerny wykaz piśmiennictwa (321 pozycji).

Jestem pod dużym wrażeniem pracowitości Autorki i bardzo wysoko oceniam jej pracę. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są bardzo wartościowe a przeprowadzone badania i bardzo skrupulatna ich interpretacja budzą moje uznanie. Praca spełnia wszystkie standardy rozpraw naukowych. Należy podkreślić, że Doktorantka opublikowała część tak cennych wyników w renomowanych czasopismach o łącznym IF=10.020.

4. Uwagi merytoryczne i formalne

Analizując rozprawę doktorską pani mgr Marty Puchta-Jasińskiej należy podkreślić, że temat pracy jest bardzo ciekawy naukowo a doktorantka opanowała bardzo wiele nowoczesnych metod badawczych. Po zapoznaniu się z pracą doktorską pani mgr Marty Puchta-Jasińskiej nie mam uwag merytorycznych i formalnych do przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej.

Chciałabym natomiast prosić Doktorantkę o przedyskutowanie następujących zagadnień:

1. Czynniki wpływające na starzenie się nasion, inne niż genetyczne.
2. Funkcja wyciszenia metabolizmu podczas długoterminowego przechowywania nasion.

5. Wniosek końcowy

Stwierdzam zatem jednoznacznie, że rozprawa doktorska mgr Marty Puchta-Jasińskiej, pt. Transkryptomyczna charakterystyka procesu starzenia się nasion *Hordeum vulgare* L. przygotowana pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Mai Karoliny Boczkowskiej, prof. IHAR-PIB i promotora pomocniczego dr Jolanty Groszyk, poza tym, że została przygotowana z wielką solidnością i starannością, stanowi ważny wkład w badania dotyczące poznania mechanizmów starzenia się nasion. Stosownie zatem do wymogów Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2011 nr 84 poz. 455), podkreślam oryginalność podjętej tematyki badawczej oraz poprawność rozwiązań metodologicznych, jak również podkreślam trafność wyprowadzonych wniosków i stwierdzam, że wszystkie te wymogi zostały spełnione. Szczególnie wysoko oceniam podjęcie trudnej analizy miRNA. Wkład Doktorantki, duża wiedza i wnikliwość w analizie i interpretacji wyników sprawiły, że jednoznacznie wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr mgr Marty Puchta-Jasińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wymienione walory merytoryczne pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

A. Piotrowicz-Cieslak

Prof. dr hab. Agnieszka Piotrowicz-Cieślak
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski Olsztynie

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Marty Puchty-Jasińskiej
pt. „Transkryptomyczna charakterystyka procesu starzenia się nasion *Hordeum vulgare* L.”

Przedłożona do oceny praca doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Perfekcyjnie scharakteryzowano pod względem występowania mikroRNA. Warto nadmienić że, zarówno funkcje jak i samo istnienie tej frakcji materiału genetycznego nie tak dawno jeszcze nie były nauce znane. Na szczególne wyróżnienie zasługuje określenie jakie geny regulowane są przez miRNA w nasionach. Przeprowadzono wzorcowo izolowanie degradomu i jego sekwencjonowanie. Szczególnie ważne dla nauki światowej jest wykazanie, że podczas przechowywania nasion miRNA nie ulegają zmianom odzwierciedlającym starzenie się nasion, są stosunkowo stabilne, natomiast mogą być ważnymi składnikami mechanizmów kontroli genetycznej uaktywniającymi się podczas kiełkowania nasion. Imponującym elementem pracy jest identyfikacja 61 znanych i 81 nowych miRNA. Na podkreślenie zasługuje wprawnie przeprowadzona analiza bioinformatyczna. Biorąc pod uwagę nowatorski i kompleksowy charakter tej rozprawy wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Recenzent rozprawy doktorskiej

Olsztyn, 4 lutego 2022

Agnieszka Piotrowicz-Cieślak