

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

Warszawa, 15 grudnia 2021r.

DZIEKANAT WYDZIAŁU
BIOTECHNOLOGII I OGRODNICTWA

Wpłynęło dnia 17. 12. 2021r.
DWB.10 520-6.1/2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Kęski pt.
„Identyfikacja ncRNA uczestniczących w potraskrypcyjnej regulacji genów
w warunkach stresu hipoksji u ogórka (*Cucumis sativus* L.)”**

Wprowadzenie

Ogórek jest jednym z najważniejszych gatunków warzyw uprawianych w gruncie jak i pod osłonami. Zarówno w uprawie gruntowej, ale też w zaawansowanych systemach uprawy szklarniowej, rośliny ogórka są narażone na zalewanie, które prowadzi do niedotlenienia korzeni i stresu hipoksji. To negatywnie wpływa na kondycję roślin i skutkuje obniżeniem plonów. W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój wysokoprzepustowych technologii sekwencjonowania DNA, co pozwala na stosowanie metod genomicznych w badaniach nad stresami. Metody te są również stosowane dla ogórka. Opublikowano szereg prac opisujących zmiany na poziomie transkryptomu w następstwie różnych stresów, jednak jak dotychczas nie badano zmian transkryptomicznych wywołanych przez hipoksję. Należy też dodać, że pracach transkryptomicznych opisywane są przede wszystkim zmiany na poziomie transkryptów kodujących białka, zaś analizy niekodującego RNA, które pełni ważną rolę regulatorową w budowaniu odpowiedzi roślin na stesy są najczęściej pomijane.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Kingi Kęski dotyczy stresu hipoksji u ogórka i skupia się na poznaniu reakcji na ten stres na poziomie transkryptomu korzeni. Badania mają kompleksowy charakter i obejmują analizę nie tylko transkryptów kodujących białka, ale też analizy niekodującego RNA uczestniczącego w regulacji ekspresji genów. Wykonana praca jest nowatorska i stanowi pierwszą całościowo przeprowadzoną analizę transkryptomiczną dla stresu hipoksji u ogórka. Praca została wykonana w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pracy jest Pani Prof. dr hab. inż. Adela Adamus, która od wielu lat zajmuje się genetyką i biotechnologią roślin warzywnych. Promotorem pomocniczym pracy jest Pani dr inż. Małgorzata Czernicka.

Dane formalne pracy

Rozprawa doktorska składa się z trzech prac opublikowanych w pismach naukowych ze znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi. Pierwsza praca została opublikowana w piśmie *Agronomy* (IF:3.4; 100 pkt MEIN), druga w *Genes* (IF:4.1; 100pkt MEIN), zaś trzecia w *International Journal of Molecular Sciences* (IF:5.9; 140 pkt MEIN). Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych publikacji jest równy 13,4 zaś łączna liczba punktów

MEIN wynosi 340. Prace zostały opublikowane w latach 2020-2021 i są ogólnie dostępne (są to publikacje w standardzie open access). Doktorantka jest drugim autorem w pierwszej pracy, w której opublikowano metodykę testowania reakcji roślin na stres hipoksji dla dwóch gatunków warzyw pomidora i ogórka. Z oświadczeń współautorów wynika, że w pracy tej wkład doktorantki był dominujący w zakresie badań nad ogórkiem – Doktorantka przeprowadziła doświadczenia z ogórkiem, a następnie na podstawie uzyskanych wyników wytypowała linie różniące się tolerancją na hipoksję do dalszych badań. Doktoranta jest pierwszym Autorem zarówno w drugiej jak i w trzeciej publikacji. Te prace obejmują wyniki analiz transkryptomicznych, w tym identyfikację niekodujących RNA i wskazują ich potencjalną rolę w regulacji ekspresji genów w następstwie hipoksji. Wkład Doktorantki w powstanie tych prac był wiodący i merytorycznie istotny: Doktorantka współuczestniczyła w opracowaniu metodologii, przeprowadziła doświadczenia, opracowała i interpretowała wyniki. Dołączone oświadczenia współautorów prac są zgodne z oświadczeniami Doktorantki.

Rozprawa oprócz publikacji obejmuje: wykaz prac stanowiących pracę doktorską, opis dorobku naukowego Doktorantki, wykaz skrótów i terminów, streszczenia, przegląd literatury, zestawienie hipotez i celów badawczych, omówienie materiałów i metod, streszczenia publikacji stanowiących pracę, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię. W pracy zostały zamieszczone informacje o tym, że badania były zrealizowane w ramach projektu badawczego Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi oraz dofinansowane z dotacji przyznanej przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Ocena pracy

W rozdziale zatytułowanym przegląd literatury Autorka przedstawiła aktualną wiedzę związaną z problematyką badawczą swej pracy. W pierwszym podrozdziale omówiła reakcje roślin na stres hipoksji zwracając uwagę na to, że rośliny posiadają „pamięć stresową”, która jest wykorzystywana w praktyce rolniczej i ogrodniczej na potrzeby „hartowania” roślin (priming). W drugim podrozdziale przeglądu literatury Autorka omówiła funkcje regulatorowe niekodujących RNA (ncRNA) w procesie adaptacji roślin do stresu z podziałem na mikro RNA (miRNA) i długie niekodujące RNA (lncRNA). W ostatnim podrozdziale przeglądu literatury Autorka opisała interakcje pomiędzy miRNA i lncRNA oraz omówiła ich znaczenie w budowaniu odpowiedzi roślin na stres. Autorka słusznie zauważyła, że jak do tej pory dla ogórka nie prowadzono badań transkryptomicznych ukierunkowanych na poznanie roli niekodujących RNA w odpowiedzi roślin na stres hipoksji - tak więc prowadzenie badań zmierzających do poznania tej roli jest wysoce zasadne. Przegląd literatury jest napisany w syntetyczny sposób i stanowi dobre wprowadzenie w problematykę badawczą pracy doktorskiej. Jest oparty o prace anglojęzyczne, które w zdecydowanej większości ukazały się w ciągu ostatnich 5 lat. To świadczy o tym, że Autorka bardzo dobrze zna aktualną światową literaturę związaną z problematyką badawczą rozprawy doktorskiej.

W kolejnych dwóch rozdziałach pracy Autorka przedstawiła hipotezy badawcze, dotyczące roli niekodujących RNA w regulacji ekspresji genów biorących udział w odpowiedzi ogórka na stres hipoksji oraz określiła cele pracy i zadania badawcze. Realizacja tych zadań pozwoliła na osiągnięcie celów pracy. Wyniki badań zostały w całości

opublikowane, dlatego też materiały i metody badawcze zostały przedstawione w skróconej wersji w streszczeniach prac stanowiących pracę doktorską, a szczegółowo opisane w poszczególnych publikacjach, co uważam za zupełnie uzasadnione.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią trzy publikacje naukowe. Należy podkreślić, że prowadzenie doświadczeń ze stresem abiotycznym i badanie odpowiedzi ogórka na stres hipoksji jest trudne zarówno pod względem technicznym jak i metodycznym. Doświadczenia takie wymagają dobrego opanowania metodyki traktowania roślin czynnikiem stresowym, muszą być dobrze zaplanowane i precyzyjnie wykonane. W zespole Katedry Biologii Roślin i Biotechnologii opracowano metodykę badania reakcji roślin na hipoksję, która jest oparta o stresowanie młodych roślin w warunkach uprawy szklarniowej i ocenę cech morfologicznych oraz fizjologicznych w następstwie hipoksji wywołanej przez kontrolowane zalanie korzeni. Autorka uczestniczyła w opracowaniu tej metodyki i skutecznie wykorzystywała ją do przetestowania 19 akcesji ogórka pochodzących z polskich firm hodowlano-nasiennych. Wśród tych akcesji były zarówno odmiany mieszańcowe jak i linie hodowlane, w tym linie podwojonych haploidów DH. Wykonane doświadczenia pozwoliły Doktorantce na pogrupowanie akcesji w zależności od reakcji na hipoksję i wskazanie linii podatnych i tolerancyjnych. Autorka wytypowała do dalszych badań dwie linie podwojonych haploidów, DH2 tolerancyjną i DH4 podatną na hipoksję (publikacja 1). Wybór tych linii uważam za właściwy i uzasadniony.

W następnym etapie prac Autorka wykorzystywała technologię RNA-seq na potrzeby analizy zmian ekspresji genów w korzeniach na poziomie transkryptomycznym (publikacje 2 i 3). Analizy zostały wykonane dla dwóch wcześniej wytypowanych linii, które poddawano stresowi hipoksji. W analizach badano transkryptomy korzeni, pobieranych w trzech punktach czasowych: po zalaniu roślin na 7 dni (1xH), po 14 dniach regenerowania się roślin po stresie (recovery) i po drugim zalaniu roślin na 7 dni (2H). Kontrolę stanowiły rośliny danej linii nie poddawane stresowi hipoksji. Dla każdej linii i punktu czasowego skonstruowano biblioteki w trzech powtórzeniach biologicznych, które zsekwencjonowano metodą Illumina. Uzyskane dane sekwencyjne analizowano wykorzystując szereg metod bioinformatycznych. Należy podkreślić, że analizy bioinformatyczne były wykonane we współpracy z zespołem doświadczonych bioinformatyków z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (dr hab. Michał Szcześniak i prof. dr hab. Izabela Makałowska), którzy zapewнили Doktorantce wsparcie metodyczne i merytoryczne.

Podstawowym etapem analiz bioinformatycznych było złożenie transkryptomu *de novo* i wykonanie adnotacji funkcjonalnej. To stanowiło punkt wyjścia do przeprowadzenia dalszych szczegółowych analiz. Autorka zidentyfikowała transkrypty o zróżnicowanej ekspresji w następstwie: (1) hipoksji, (2) regeneracji postresowej oraz (3) odpowiedzi roślin na drugi epizod stresowy. Autorka pokazała, że w następstwie hipoksji zdecydowanie większa liczba genów ulega zróżnicowanej ekspresji u linii podatnej DH4 (ok. 9 tys. genów) w porównaniu z linią tolerancyjną DH2 (ok. 6 tys. genów). Po kolejnym epizodzie stresowym ta różnica pogłębiła się jeszcze bardziej (11.5 tys. i 5 tys. genów). Również po 14-dniowym okresie regenerowania się roślin po stresie znaczenie więcej genów ulegało zróżnicowanej ekspresji u linii podatnej (ok. 1800 genów) w porównaniu z linią tolerancyjną (ok. 650

genów). Wyniki te świadczą o tym, że stres hipoksji wywołany przez 7-dniowe zalanie roślin jest bardzo drastyczny w przypadku linii podatnej, a jednocześnie sugerują, że w przypadku linii tolerancyjnej pierwszy epizod stresowy ma charakter primingu i włącza „pamięć stresową” roślin. Autorka określiła kategorie funkcjonalne genów ulegających zróżnicowanej ekspresji i wskazała te, które mogą być zaangażowane w nabywanie tolerancji na stres. Dla wybranych trzech genów wykonała analizę RT-qPCR by zweryfikować i uszczegółwić profile ich ekspresji (publikacja 2). Zgadza się ze stwierdzeniem Doktorantki, że wyniki analiz transkryptomicznych potwierdzają zróżnicowaną odpowiedź badanych linii na hipoksję i sugerują, że zalanie roślin może stanowić czynnik wspomagający nabywanie tolerancji na hipoksję. Nasuwa się jednak pytanie: czy skoro hipoksja wpływa na ekspresję genów związanych z biosyntezą etylenu, a etylen uczestniczy w kształtowaniu płci roślin ogórka, to czy zastosowanie hipoksji na potrzeby primingu nie będzie miało niekorzystnego wpływu na ekspresję płci roślin.

Najważniejszym etapem pracy była identyfikacja długich niekodujących RNA i mikro RNA oraz oddziaływań w obrębie różnych typów RNA (publikacja 3). Należy podkreślić, że jest to bardzo aktualny i konkurencyjny obszar badań genomiki funkcjonalnej. Wykorzystując swój układ badawczy Autorka zidentyfikowała 3.7 tysiąca długich niekodujących RNA, co stanowiło około 10% wszystkich transkryptów. Następnie wykonała szereg analiz bioinformatycznych, wskazując lncRNA ulegające zróżnicowanej ekspresji i geny (około 2000), które mogą być regulowane w następstwie hipoksji przez lncRNA. Były to grupy genów związane z aktywnością endopeptydazy i ze zranieniem. Wśród tych genów są geny kodujące czynnik transkrypcyjny SCARECROW czy też hydrolaza/transglikozylaza ksyloglukanu (XET) związana z przebudową ściany komórkowej. Co ciekawe, wcześniej wiązano te geny ze zdolnością roślin ogórka do regeneracji *in vitro*, jednakże nie postulowano jednak potranskrypcyjnej regulacji ich ekspresji (Wiśniewska i wsp. 2012, Plant Phys Biochem 50:54-64). Jednocześnie Autorka wykonała sekwencjonowanie i analizy mikro RNA identyfikując łącznie 684 miRNA, w tym nowe nieopisane wcześniej miRNA i wskazała 19 miRNA ulegających różnicowej ekspresji w następstwie hipoksji. Dla wybranych lncRNA i miRNA wyniki zostały zwalidowane z wykorzystaniem qRT-PCR. W ostatnim etapie pracy, Autorka wskazała sześć lncRNA, które mogą być regulowane przez siedem różnych miRNA w następstwie hipoksji. Jest to bardzo interesujący wynik. Jak dotychczas dla ogórka nie opisywano takich interakcji i publikacja 3 Autorki jest w tym zakresie pionierska. W moim odczuciu wykonanie analizy degradacji korzeni dla wypracowanego układu doświadczalnego pozwoliłoby zapewne jeszcze lepiej opublikować te wyniki.

W rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski” rozprawy Autorka podsumowała najważniejsze wyniki badań w postaci tabeli i przedstawiła w punktach najważniejsze osiągnięcia pracy. Zestawienie tabelaryczne w jasny sposób pokazuje najważniejsze wyniki uzyskane w następstwie złożonych i wielowątkowych analiz bioinformatycznych. Myślę jednak, że ten rozdział mógłby być lepiej zredagowany poprzez wydzielenie najważniejszych wniosków wynikających z wykonanych badań.

Reasumując, Autorka osiągnęła zakładane cele pracy, a uzyskane wyniki są oryginalne i wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat odpowiedzi ogórka na stres. Szczególnie

nowatorska jest część pracy dotycząca identyfikacji nowych długich niekodujących RNA i mikro RNA oraz ich potencjalnych interakcji w korzeniach ogórka w następstwie hipoksji. Wymiernym efektem zrealizowanej pracy są oryginalne zbiory danych transkryptomicznych, które zostały zdeponowane w publicznych bazach danych.

Na podkreślenie zasługuje duża aktywność naukowa Autorki, która wykonując pracę doktorską zaangażowała się również w realizację innych projektów badawczych, czego efektem były wartościowe publikacje naukowe. Sumaryczny współczynnik wpływu wszystkich publikacji Autorki wynosi 31 (760 punktów MEIN). Doktorantka odbyła także krótkoterminowe staże: zagraniczny w Luxembourg Institute of Science and Technology (2 miesiące) i dwa staże krajowe w Zakładzie Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Jagiellońskiego (3 miesiące) oraz w Katedrze Cytologii i Embriologii Roślin Uniwersytetu Gdańskiego (1 miesiąc). Te aktywności świadczą o dużym zaangażowaniu doktorantki w prace badawcze i silnej motywacji w dążeniu do poszerzania swoich umiejętności i rozwijania warsztatu badawczego.

Uwagi do pracy

Wobec tego, że wyniki pracy doktorskiej zostały w całości opublikowane nie jest łatwo recenzującemu o uwagi krytyczne w stosunku do merytorycznej strony pracy. Niemniej nasuwa mi się kilka spostrzeżeń i pytań związanych z wykonaną pracą.

1. W analizach transkryptomicznych wykorzystano dwie linie podwojonych haploidów ogórka różniących się tolerancją na hipoksję. Jestem ciekawy, czy linie te były podobne czy też różniły się od siebie pod względem cech morfologicznych? Jaka była płeć, barwa kolców i typ owoców tych linii? Czy być może porównano ze sobą transkryptomy tych linii w warunkach kontrolnych?
2. W wyniku złożenia transkryptomu *de novo* uzyskano prawie 37 tysięcy transkryptów, które odpowiadały 19 tysiącom unigenów. Prosiłbym o komentarz dotyczący złożenia transkryptomu *de novo*. Z jednej strony wydaje się, że jest to dużo, ale z drugiej strony wydaje się, że jest mało. Czy w innych pracach uzyskiwano podobne wyniki? W puli zidentyfikowanych transkryptów duży udział stanowiły transkrypty dłuższe niż 4 kb - czy można coś więcej powiedzieć o ich funkcjach?
3. Jestem również ciekawy, które ze wskazanych interakcji i ścieżek regulatorowych związanych z tolerancją na hipoksję Autorka wytypowałaby do dalszych szczegółowych badań.

Mam też dwie uwagi związane ze stosowaną przez Autorkę terminologią, które pozwalam sobie wskazać, lecz tylko z obowiązku recenzenta, gdyż nie mają one wpływu na merytoryczną ocenę pracę:

1. strona 12 wiersz 27: określenie „dziki pomidor” jest określeniem żargonowym i jednocześnie nieprecyzyjnym, powinna być podana nazwa łacińska tego gatunku (*Solanum habrochaites* Knapp and Spooner, dawniej *Lycopersicon hirsutum* Dunal),
2. strona 24 wiersz 14: „egzon” ze względu na pochodzenie tego słowa od słowa „ekspresja” bardziej uzasadnione jest stosowanie terminu „ekson”.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca Pani mgr Kingi Kęski dotyczy ważnej problematyki badawczej jaką jest poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzi roślin na stres hipoksji. Praca stanowi logiczną całość i została wykonana z wykorzystaniem głębokiego sekwencjonowania transkryptomów w połączeniu z zaawansowanymi metodami bioinformatycznymi oraz fizjologicznymi. Cele pracy zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki są nowatorskie i zostały w całości opublikowane. Autorka rozprawy pokazała, że potrafi stawiać hipotezy badawcze i je weryfikować doświadczalnie. Na podkreślenie zasługuje duża aktywność naukowa Doktorantki. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe elementy stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość naukową pracy wnioskuję o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski