

dr hab. inż. Stefan Stojalowski, prof. ZUT  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
ul. Słowackiego 17  
71-434 Szczecin

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

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Kingi Kęski została wykonana w Katedrze Biologii Roślin i Biotechnologii Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja. Promotorem pracy jest prof. dr hab. inż. Adela Adamus, a promotorem pomocniczym dr inż. Małgorzata Czernicka. Rdzeń rozprawy stanowi cykl trzech tematycznie powiązanych artykułów naukowych, które zostały opublikowane w krótkim okresie obejmującym ostatnie dwa lata (2020-2021). Wszystkie trzy prace opublikowano w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, których wartości współczynnika Impact Factor (IF) według najnowszej wersji bazy Journal Citation Reports za 2020 rok mieszczą się w granicach od 3,417 do 5,923. Sumaryczny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej jest bardzo znaczący i wynosi 13,436. Wszystkie trzy prace miały charakter wieloautorski. W dwóch publikacjach (nr 2 i nr 3) doktorantka była pierwszą autorką, a załączone oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na jej znaczący udział przy opracowywaniu założeń, metodyki i wykonaniu prac badawczych. Jedynie w artykule nr 1 doktorantka została ujęta na liście autorów jako druga w kolejności, ale treść artykułu oraz załączonych oświadczeń współautorów szybko przynosi wyjaśnienie, czemu tak się stało. Artykuł nr 1, do którego wróć jeszcze w dalszej części tej recenzji, opisuje prace badawcze zmierzające do wytypowania genotypów odpornych i wrażliwych na stres hipoksji, ale opisane w nim badania dotyczą nie tylko ogórka, który był przedmiotem rozprawy pani Kingi Kęski – drugim opisanym w artykule gatunkiem był pomidor. Oświadczenia współautorów publikacji nr 1 wskazują jednoznacznie, że w zakresie badań nad liniami podwojonych haploidów ogórka, będących przedmiotem dalszych publikacji wchodzących w skład rozprawy, to właśnie doktorantka była liderką wykonanych i opisanych analiz. Poza odciskami prac wchodzących w skład rozprawy, w ocenianym manuskrypcie doktorantka zamieściła wprowadzenie, w którym znalazły się informacje o dorobku naukowym autorki, wykaz używanych w pracy skrótów, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, syntetyczny przegląd literatury, hipotezy i cele badawcze oraz skrócony opis wyników wraz z podsumowaniem i wnioskami.

Badania wykonane przez mgr Kingę Kęskę nakierowane zostały na poszukiwania niekodujących cząsteczek RNA zaangażowanych w regulację ekspresji genów ogórka uczestniczących w reakcji roślin na stres hipoksji. Hipoksja to niedobór tlenu, który prowadzi do zaburzeń normalnego funkcjonowania komórek zwierzęcych i roślinnych. U roślin hipoksja dotyka najczęściej komórki systemu korzeniowego i jest konsekwencją okresowego

nadmiernego uwilgotnienia podłoża. Gdy gleba, w której rosną rośliny, jest nadmiernie zasobna w wodę, to dostępność tlenu gwałtownie spada i komórki systemu korzeniowego są wystawione na działanie stresu o charakterze abiotycznym. W praktyce plantacje ogórka mogą znaleźć się w takiej sytuacji zarówno przy uprawie gruntowej, jak i szklarniowej. Zmiany klimatyczne, które obserwujemy w naszym otoczeniu (niezależnie od przyczyn tego procesu) objawiają się wzrostem częstotliwości występowania sytuacji o charakterze ekstremalnym. Z jednej strony odnotowujemy skrajnie wysokie temperatury i coraz bardziej długotrwałe okresy bez opadów (susze), a jednocześnie w tej samej strefie klimatycznej pojawiają się niespotykane wcześniej wichury i obfite deszcze powodujące okresowe zalania pól (podtopienia i powodzie). Nikt chyba nie potrafi jednoznacznie stwierdzić, czy te zmiany klimatyczne uda się zahamować, więc hodowla roślin powinna szukać już teraz możliwości dostosowania przyszłych odmian do nowych warunków środowiskowych. Taki był cel nadrzędny badań podjętych przez doktorantkę – celem było opracowanie teoretycznych podstaw dla zrozumienia reakcji tolerancji ogórka na niedobór tlenu wynikający z okresowego nadmiaru opadów atmosferycznych. Oczywiście ogórek może być również produkowany w kontrolowanych warunkach w szklarniach. W tym wypadku wyniki badań mgr Kingi Kęski też nie są pozbawione utylitarnego charakteru. W czasach, gdy systemy nawadniania w szklarniach są coraz bardziej zautomatyzowane, nie można wykluczyć awarii, które mogą doprowadzić do okresowego zalania plantacji. Uprawa odmian odpornych na tego typu zdarzenia może znacząco ograniczyć skalę strat ekonomicznych w przypadku ich wystąpienia. W związku z powyższym uważam, że tematyka badań podjęta przez mgr Kingę Kęskę jest nie tylko interesująca od strony naukowej, ale ma też istotne znaczenie dla praktyki i doskonale wpisuje się w obszar zainteresowań dyscypliny naukowej „Rolnictwo i ogrodnictwo”.

W sprawnym zrealizowaniu pracy doktorskiej pomogły pani Kindze Kęsce poprawnie sformułowane hipotezy badawcze oraz powiązane z nimi konkretne cele badawcze. Dla czytelnika rozprawy zapoznanie się z hipotezami i celami stawianymi przez doktorantkę jest również istotne. Lektura samych artykułów naukowych nie pozostawia wątpliwości, że są one powiązane tematycznie, ale zaskakujący wydaje się tytuł rozprawy wskazujący na zainteresowanie niekodującymi cząsteczkami RNA. Zaskoczenie to może wynikać z faktu, że tylko ostatnia z prac wchodzących w skład rozprawy traktuje o tej kategorii cząsteczek. Sekwencja celów badawczych sformułowanych przez panią Kęskę wskazuje jednoznacznie, że prace badawcze opisane w publikacjach nr 1 i 2 stanowiły tworzony przez nią fundament dla zweryfikowania postawionych hipotez, co znalazło swoje miejsce w publikacji nr 3. Dzięki temu autorce udało się uwypuklić spójność cyklu prac oraz logiczność kolejnych etapów badań opisanych w niezależnych artykułach opublikowanych w różnych czasopismach naukowych.

Pierwsza z publikacji ukazała się w czasopiśmie *Agronomy* (IF<sub>2020</sub>:3,417; Wykaz MEiN:100pkt.) w roku 2020. Materiał badawczy w tej pracy pochodził z trzech polskich firm hodowlano-nasiennych, a składały się na niego linie hodowlane, odmiany i mieszańce ogórka (19 genotypów) oraz pomidora (16 genotypów). Autorzy zaplanowali eksperymenty szklarniowe, w których wywoływali stres hipoksji w obrębie systemu korzeniowego roślin, aby ocenić, czy badane genotypy wykazują zróżnicowane reakcje na okresowe zalanie podłoża. Eksperymenty wykonano w trzech seriach, a reakcje na stres oceniano na podstawie

porównań do prób kontrolnych utrzymywanych w warunkach optymalnych dla wzrostu roślin. Jedna seria doświadczalna dotyczyła genotypów pomidora, kolejna – piętnastu odmian i linii hodowlanych ogórka, a ostatnia – czterech wysoce homozygotycznych linii podwojonych haploidów (DH) ogórka. Pani Kinga Kęska uczestniczyła w realizacji wszystkich eksperymentów, ale jej główny udział dotyczył badań linii DH ogórka, co jest zrozumiałe, gdyż do realizacji dalszych celów badań najbardziej przydatne były genotypy wysoce homozygotyczne. Ocena wrażliwości vs. tolerancji na stres hipoksji była oparta o ocenę cech morfologicznych oraz parametrów fizjologicznych (pomiar fluorescencji chlorofilu a). Autorzy pracy obserwowali znaczącą zmienność we wszystkich trzech grupach badanych genotypów i zdołali w każdej z nich wytypować formy wrażliwe i względnie tolerancyjne. Pisząc o „względnej tolerancji” chciałem zaznaczyć, że wytypowane w pracy jako najbardziej tolerancyjne genotypy GM-50 ogórka oraz POL 7/15 pomidora w pewnym niewielkim stopniu reagowały na stres hipoksji, ale na zamieszczonych w pracy wykresach radarowych wyraźnie daje się zauważyć, że były to reakcje znikome w porównaniu do tego jak zmieniały się badane parametry cech u form wrażliwych (ogórek ‘Tytus’ i pomidor PZ 215). Na tym etapie recenzji muszę wyrazić jedną z niewielu uwag krytycznych wobec rozprawy opracowanej przez mgr Kingę Kęskę: opis wyników eksperymentu kluczowego dla jej dalszych działań, tj. tego w którym badano linie DH, jest w załączonym artykule bardzo ogólny, a dostępność szczegółowych danych ograniczona. Szkoda, że autorka do streszczenia publikacji nr 1 nie dołączyła wykresów ilustrujących analizę skupień i wykresów radarowych ilustrujących reakcje wyselekcjonowanych do dalszych badań linii: DH2 (tolerancyjnej) i DH4 (wrażliwej). Inną opcją byłoby dołączenie do manuskryptu rozprawy nie tylko treści artykułu nr 1, ale też załącznika elektronicznego – obejmuje on zaledwie 3 strony, a dzięki temu najważniejsze dla pracy doktorskiej dane byłyby w komplecie wydrukowane i nie byłoby potrzeby poszukiwania ich w internecie. Niezależnie jednak od tego drobnego niedociągnięcia edytorskiego, pragnę podkreślić, że opisane w publikacji nr 1 metodycznie przemyślane doświadczenie pozwoliło pani mgr Kinge Kęsce na wyselekcjonowanie dwóch linii DH o przeciwstawnym typie reakcji na stres hipoksji, co było niezbędne dla realizowania dalszych etapów pracy doktorskiej.

Druga publikacja cyklu to obszerne opracowanie wyników analiz RNA-seq opublikowane w 2021 roku w czasopiśmie Genes (IF<sub>2020</sub>:4,096; Wykaz MEiN:100pkt.). Materiałem do badań były wyselekcjonowane w ramach publikacji nr 1 dwie linie DH (tolerancyjna i wrażliwa). Autorzy zaplanowali złożone doświadczenie, w którym poza analizą transkryptomu wykonano oceny wybranych cech morfologicznych. Punktem odniesienia dla roślin poddanych stresowi były rośliny kontrolne rosnące w warunkach optymalnych. W doświadczeniu badano nie tylko bezpośrednią reakcję na niedobór tlenu w podłożu, ale także zmiany następujące po ustąpieniu stresu (dwutygodniowy okres regeneracji) oraz - co bardzo interesujące - reakcję roślin na ponowny stres hipoksji wywołany po zregenerowaniu roślin. Ten ostatni element doświadczenia został zaplanowany w celu określenia czy i w jakim stopniu badane linie DH (tolerancyjna i wrażliwa) „pamiętają” pierwszy stres i czy dzięki temu potrafią lepiej poradzić sobie, gdy ten sam czynnik stresowy pojawi się ponownie. Pomiar parametrów morfologicznych oraz analizy RNA-seq wykonywano na trzech etapach: po 7 dniach od zalania korzeni wodą (na koniec pierwszego stresu hipoksji), po 21 dniach od rozpoczęcia eksperymentu (gdy rośliny poddane stresowi przez 2 tygodnie regenerowały się

w optymalnych warunkach) oraz po 28 dniach (gdy zostały poddane ponownemu, trwającemu 1 tydzień zalaniu korzeni wodą). Na każdym etapie rośliny poddane stresowi były porównywane z próbą kontrolną roślin rosnących cały czas w warunkach optymalnych. Uzupelnieniem tego złożonego eksperymentu były analizy profilu ekspresji trzech genów wskazywanych w literaturze jako potencjalnie związane z odpowiedzią na stres hipoksji. Były to: dehydrogenaza alkoholowa (*adh*), oksydaza 1-aminocyklopropano-1-karboksylianowa (*aco*) i syntaza długołańcuchowa acylo-CoA 6 (*lacs6*). Próby tkanek do tych analiz były pobierane w czasie doświadczenia aż 9 razy (po 1, 2, 3, 7, 21, 22, 23, 24 i 28 dniach od zainicjowania pierwszego stresu). Szeroko zakrojona analiza wyników sekwencjonowania RNA (RNA-seq) z roślin poddanych zalaniu oraz roślin kontrolnych pozwoliła na wykonanie nowych złożeń transkryptomów oraz zidentyfikowanie transkryptów, których ekspresja ulegała zróżnicowaniu w wyniku stresu. Po pierwszym stresie hipoksji liczba takich genów była wyraźnie większa u linii wrażliwej (prawie 9 tys.) niż u tolerancyjnej (niespełna 6 tys.). W okresie regeneracji liczba genów o zróżnicowanej ekspresji wyraźnie malała. Ponowny stres spowodował kolejne zmiany w transkrypcji cząsteczek RNA, ale u linii tolerancyjnej liczba transkryptów o zróżnicowanej ekspresji była nieznacznie mniejsza niż w czasie pierwszego stresu (ok. 5 tys.), a u linii wrażliwej wyraźnie większa (ponad 11,5 tys.). Analiza sekwencji transkryptomów pozwoliła też na wskazanie konkretnych szlaków regulowanych przez geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w wyniku stresu hipoksji. Oczywiście opisane wyniki nie wyjaśniają całej złożoności mechanizmu odpowiedzi na stres hipoksji, ale stanowią istotny przyczynek do dalszych badań tego problemu.

Trzecia z publikacji wchodzących w skład rozprawy ukazała się w 2021 roku w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IF<sub>2020</sub>:5,923; Wykaz MEiN:140pkt.). Opisano w niej analizę ekspresji niekodujących cząsteczek RNA pod wpływem stresu hipoksji. Materiał badawczy stanowiły te same dwie linie (DH2 – tolerancyjna i DH4 – wrażliwa), które wyselekcjonowano w badaniach opisanych w pracy nr 1, a bazą do identyfikacji długich niekodujących cząsteczek RNA (lncRNA) były złożeń transkryptomów opisane w publikacji nr 2. Cząsteczki lncRNA stanowiły ok. 10% ogólnej liczby transkryptów zidentyfikowanych w liniach DH ogórka. Wśród cząsteczek lncRNA ponad jedną trzecią stanowiły cząsteczki transkrybowane w obrębie egzonu genu docelowego, ale na nici komplementarnej – była to najliczniej reprezentowana kategoria wśród długich niekodujących cząsteczek RNA. Zróżnicowanie ekspresji lncRNA było większe po pierwszym stresie, niż po ponownym zalaniu korzeni roślin. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na wskazanie ponad 2200 genów, które mogą podlegać regulacji przez wykryte lncRNA.

Dodatkowo w tej samej publikacji wykonano izolację RNA w celu przygotowania bibliotek sekwencyjnych małych niekodujących cząsteczek (miRNA). Dzięki wykonanym analizom zidentyfikowano grupę nieznaną dotąd cząsteczek miRNA, których synteza jest powiązana z reakcją na stres hipoksji u ogórka oraz wskazano geny, których ekspresja może być potranskrypcyjnie regulowana przez te cząsteczki. Dodatkowo wskazano na potencjalne interakcje, które mogą zachodzić między długimi i krótkimi niekodującymi cząsteczkami RNA.

Próby RNA pobrane w drugim dniu po zalaniu korzeni wodą pozwoliły na wskazanie cząsteczek miRNA oraz walidację metodą qRT-PCR ośmiu lncRNA podlegających regulacji

już na początku działania czynnika stresowego. Z kolei analiza porównawcza sekwencji RNA ulegających zróżnicowanej ekspresji w czasie pierwszego i drugiego stresu, pozwoliła na wytypowanie 6 genów i 71 cząsteczek lncRNA, które mogą być odpowiedzialne za nabywanie tolerancji przez rośliny i łagodniejsze reakcje na ponowne zalanie systemu korzeniowego.

Uzyskane dane dotyczące funkcjonowania niekodujących cząsteczek RNA w roślinach ogórka poddanych stresowi zalania są bardzo obszerne, ale ze względu na kompleksowość procesów biologicznych wyniki nie wyjaśniają w pełni roli tych cząsteczek i mechanizmów ich działania. Wnoszą jednak istotną wiedzę pozwalającą na sformułowanie pierwszych wniosków, a także nowych hipotez niezbędnych do planowania dalszych badań.

Wnioski wynikające z badań opisanych w cyklu publikacji zostały przez mgr Kingę Kęskę sformułowane w 9 punktach na stronach 29-30 rozprawy. Zostały one zredagowane starannie i potwierdzają, że cele pracy zostały osiągnięte.

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że od strony edytorskiej przedłożony manuskrypt (określony mianem autoreferatu) został przed doktorantką przygotowany z dużą starannością – układ treści jest bardzo czytelny, ale jednocześnie opisy nie są nadmiernie rozwlekłe, a mimo to zawierają wszystkie istotne treści (wyjątkiem jest wspomniany przeze mnie wcześniej brak danych o wstępnych wynikach działania stresu hipoksji na zestaw linii DH). Bardzo pozytywnie oceniam też trud włożony przez autorkę w przygotowanie tabelarycznego zestawienia podsumowującego wyniki badań (str. 28). Pomimo ogólnie bardzo pozytywnego odbioru przygotowanego przez doktorantkę wprowadzenia do lektury artykułów wchodzących w skład rozprawy, z obowiązku recenzenta chciałbym wskazać dwa elementy, które można by było udoskonalić:

1. Kolejność celów badawczych nr 3 i nr 4 w aktualnym brzmieniu sprawia wrażenie nielogicznej. Może warto by było uwypuklić, że cel numer 4 dotyczy tylko części niekodujących RNA: miRNA oraz ośmiu wybranych lncRNA (?)
2. Autorka w polskojęzycznych streszczeniach artykułów używa czasami spolszczonych słów zaczerpniętych z języka angielskiego (np. unigeny – str. 20; spleicosom – str. 21). Jest to częsty problem we współczesnych pracach genetycznych – słownik języka polskiego nie nadąża za postępem naukowym i sam często staje przed dylematem, jak napisać coś w zgodzie z naszym ojczystym językiem, a jednocześnie nie rozwlekać opisu. Oczywiście znaczenie tych słów jest łatwe do zrozumienia, ale w takich wypadkach można by zastosować zabieg, który pani mgr Kęska wykonała na stronie 14, gdzie słowo „target” zostało najpierw definiowane, a dopiero potem używane w dalszej części tekstu.

Powyzsze dwie uwagi mają charakter dyskusyjny i nie umniejszają mojej pozytywnej oceny całej pracy.

Przy zapoznawaniu się z treścią rozprawy nasunęły mi się trzy zagadnienia, co do których chciałbym podjąć dyskusję z panią Kingą Kęską przy okazji publicznej obrony doktoratu:

1. Wspomniałem już wcześniej w tej recenzji, że dane dotyczące charakteru reakcji linii DH2 i DH4 na stres są opisane w publikacji nr 1 bardzo ogólnikowo. Mam nadzieję na uzyskanie dokładniejszych informacji nt. tego, które z badanych cech morfologicznych i fizjologicznych ulegały zmianom pod wpływem stresu i czy

- reakcje linii DH odpornej i tolerancyjnej były podobne do tego, jak reagowały genotypy GM-50 oraz odmiana Tytus.
2. Próby pobierane do RNA-seq były reprezentowane przez trzy powtórzenia biologiczne, ale nie za wiele informacji znalazłem o tym, czy wyniki dla tych powtórzeń charakteryzowały się dużą zmiennością, czy też były we wszystkich wypadkach podobne w stopniu zadowalającym.
  3. Ciekaw jestem opinii doktorantki czy celowe uodparnianie roślin na stres poprzez sztuczne jego indukowanie we wczesnych fazach rozwoju może znaleźć zastosowanie w praktyce.

### **Podsumowanie**

Wyniki zawarte w rozprawie doktorskiej pani mgr Kingi Kęski są obszerne, zostały pozyskane w oparciu o bardzo dobrze zaplanowane i metodycznie poprawnie wykonane eksperymenty. Opracowanie statystyczne i bioinformatyczne zostało wykonane z zastosowaniem zróżnicowanych metod, dzięki czemu interpretacja wyników nie budzi wątpliwości, a sformułowane wnioski są poprawne. Postawione w pracy doktorskiej cele zostały osiągnięte i rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Tym samym, w mojej ocenie, praca mgr Kingi Kęski w zupełności spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Dlatego **wniosuję do Rady Dyscypliny Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kollątaja w Krakowie o dopuszczenie mgr inż. Kingi Kęski do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo kompleksowe i metodycznie poprawne podejście doktorantki do rozwiązywanego problemu (od wyselekcjonowania materiału roślinnego do badań, poprzez przemyślane zaplanowanie eksperymentów szklarniowych, zebranie kompletu danych o transkryptomach badanych obiektów, aż po analizy bioinformatyczne niekodujących cząsteczek RNA), a także nowatorski charakter wykonanych badań, **chciałbym prosić Radę Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo UR w Krakowie o rozpatrzenie możliwości wyróżnienia tej pracy.**

Szczecin, 17.12.2021.

*Stojałowski*

dr hab. inż. Stefan Stojałowski