

Prof. dr hab. Paweł Krajewski

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Ocena pracy doktorskiej mgr Aleksandry Skalskiej

„Porównawcza analiza molekularna *Brachypodium distachyon* w celu poznania mechanizmów adaptacji do warunków środowiska”

1. Zakres pracy

Praca doktorska mgr Aleksandry Skalskiej opisuje wyniki badania akcesji *Brachypodium distachyon* prowadzonych w celu stwierdzenia, czy różnice pomiędzy nimi na poziomie molekularnym i fenotypowym mają związek z ich pochodzeniem z różnych lokalizacji charakteryzujących się zmiennymi warunkami środowiskowymi. Materiał badawczy obejmował formy zebrane na terenie Turcji. Zastosowane metody to analiza polimorfizmu pojedynczych nukleotydów, analiza metylacji DNA, analiza profili metabolomicznych i fenotypowanie za pomocą obrazowania w warunkach optymalnego i obniżonego nawadniania. Dodatkowo zbadano reakcję linii *Brachypodium* uznanej za referencyjną na podwyższone zasolenie gleby przeprowadzając analizy cytogenetyczne, obserwacje kiełkowania i rozwoju korzeni, analizę ekspresji wybranych genów, analizę modyfikacji histonów oraz analizę podziałów komórkowych.

2. Opis formalny pracy

Praca składa się z sześciu rozdziałów, z których najważniejsze to: I. „Autoreferat rozprawy” przedstawiający wprowadzenie do rozważanych zagadnień, cele pracy, podsumowanie metod i wyników oraz dyskusję; II. „Publikacje wchodzące w skład rozprawy” zawierający reprinty trzech artykułów naukowych, w których opublikowano wyniki składające się na rozprawę; oraz III. „Wnioski” wymieniający najważniejsze konkluzje. Pracę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów publikacji o wkładzie w poszczególne badania. Cała praca liczy 105 stron.

3. Ocena sposobu realizacji

Współczesne badania biologiczne pokazują, że cechy oraz zachowania organizmów determinowane są nie tylko przez genom rozumiany jako sekwencja nukleotydów, lecz przez szerzej rozumiane własności chromatyny. Tak więc praca polegająca na opisaniu różnic genetycznych oraz różnic w metylacji DNA w roślinach *Brachypodium* w kontekście przystosowania do środowiska, co stanowiło pierwszy cel pracy, sytuuje się wśród ważnych tematów podejmowanych przez genomikę roślin. Działanie genomu i epigenomu przejawia się w syntezie metabolitów pierwotnych i wtórnych, która jest modyfikowana przez czynniki stresowe, czemu poświęcony został cel drugi. Trzecim celem była szczegółowa analiza reakcji roślin na stres solny w warstwie procesów komórkowych.

Wymienione wyżej cele realizowano w badaniach, których wyniki są przedstawione w trzech pracach opublikowanych w czasopismach *International Journal of Molecular Sciences* oraz *Cells*. Publikacja oznaczona jako II.1 pt. „Genetic and methylome variation in Turkish *Brachypodium distachyon* accessions differentiate two geographically distinct subpopulations” przedstawia szczegółowo wykorzystane akcesje *Brachypodium*. Następnie opisuje wyniki uzyskane na podstawie genotypowania SNP i obserwacji metylacji DNA w kontekstach CpG, CHG i CHH. Stwierdzono, iż akcesje różniące się pochodzeniem, zebrane w różnych obszarach Turcji, różnią się zarówno genomem, jak i metylomem. Podobny podział na dwie podgrupy otrzymano na podstawie obserwacji objawów stresu suszy mierzonych poprzez obrazowanie i zliczanie żółtych pikseli. Aby dodatkowo opisać podział terytorialny akcesji, zebrano wartości zmiennych klimatycznych opisujących siedliska roślin i zastosowano kryterium maksymalnej entropii i algorytm uczenia maszyn do znalezienia zmiennych najlepiej wyjaśniających obecność roślin w danym regionie.

Publikacja II.2 pt. „Metabolomic variation aligns with two geographically distinct subpopulations of *Brachypodium distachyon* before and after drought stress” opisuje wyniki badań metabolomu akcesji wykorzystanych w publikacji II.1. Profile metaboliczne określano dla roślin uprawianych w warunkach optymalnych oraz z zastosowaniem różnych wariantów ograniczonego nawadniania stosując chromatografię cieczową i spektrometrię mas. Na podstawie obserwacji w warunkach optymalnych stwierdzono, że cała badana populacja dzieli się na grupy odpowiadające pochodzeniu z regionów centralnego i nadbrzeżnego. Podobny wniosek otrzymano analizując obserwacje w warunkach stresowych. Wskazano metabolity, które najbardziej wpływają na taki podział. Wyniki zinterpretowano poprzez analizę szlaków metabolicznych reprezentowanych przez obserwowane związki chemiczne.

Publikacja II.3 pt. „Defining the cell wall, cell cycle and chromatin landmarks in the responses of *Brachypodium distachyon* to salinity” podejmuje temat reakcji roślin na zasolenie gleby posługując się jednym genotypem *Brachypodium*. Reakcja tej formy na stres została poddana analizom ekspresji genów, kiełkowania, morfologii korzeni, analizom cytogenetycznym, podziałów komórkowych i modyfikacji białek histonowych. Głównym wynikiem prac było zidentyfikowanie najważniejszych efektów nadmiernego zasolenia w aspekcie morfologii i procesów molekularnych zachodzących w roślinach.

Przedstawione trzy publikacje świadczą o tym, że sformułowane cele badań zostały osiągnięte. Należy też uznać, że badania doprowadziły do uzyskania nowych wyników dotyczących badanego gatunku roślin. Odkrycie związku pomiędzy pochodzeniem geograficznym roślin a ich własnościami molekularnymi zasługuje na uwagę, gdyż wcześniejsze prace nie potwierdzały tego faktu. Wyniki mogą mieć znaczenie dla badania przystosowania do środowiska gatunków spokrewnionych, w tym gatunków uprawnych. Jak stwierdza się w publikacji II.3, uzyskane informacje mogą być ważne dla planowania kolejnych badań na temat przystosowania i reakcji roślin na stresy abiotyczne.

Badania prowadzone były we współpracy kilku zespołów, a przedstawione publikacje są wieloautorskie. Wkład Doktorantki we wszystkie trzy publikacje jest bardzo istotny. Według

przedstawionych oświadczeń oraz informacji podanych w publikacjach, w przypadku publikacji II.1 i II.2, w których jest pierwszą autorką, obejmował przeprowadzenie doświadczeń i obserwacji fenotypowych, izolację DNA i metabolitów, analizę danych z sekwencjonowania i analiz spektroskopowych oraz opracowanie wyników i manuskryptu; należy te role określić jako decydujące o powodzeniu badań. W publikacji II.3 wkład Doktorantki polegał na izolacji RNA i metabolitów, wykonaniu części analiz cytochemicznych, analizie i opracowaniu wyników oraz opracowaniu manuskryptu.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano współcześnie stosowane metody analizy własności i reakcji roślin. Doktorantka wykazała się opanowaniem szeregu różnych protokołów doświadczalnych oraz procedur analizy danych. Przedstawione publikacje są napisane w przystępny sposób, a język jest precyzyjny. Zapewnione są właściwe proporcje poszczególnych części manuskryptów.

4. Uwagi i pytania

1. Uzyskane wyniki są szeroko dyskutowane w ramach każdej z przedstawionych publikacji, a także w formie skróconej w Autoreferacie. Brakuje jednak próby powiązania uzyskanych wyników lub przedstawienia możliwych podejść do integracji wyników. Takie rozważania, oczywiście w formie pozbawionej spekulacji, mogłyby podnieść wartość całej dysertacji.
2. W publikacji II.1 poddano analizie w sposób całogenomowy metylację DNA. Proszę o sprecyzowanie jakie dokładnie wyniki stanowiły dane wejściowe do analiz grupowania i jakie miary podobieństwa lub odległości pomiędzy „profilami metylacji” zastosowano, oraz jaki algorytm grupowania.
3. W publikacji II.1 wykazano, iż dane opisujące genom oraz dane opisujące metylację DNA pozwalają uzyskać podobny podział akcesji na dwie grupy. W analizach wykorzystano obserwacje polimorfizmu SNP oraz położenie miejsc zmetylowanych w sekwencji referencyjnej *Brachypodium*. Nie są to niezależne źródła danych. Wydaje się, że wyższe podobieństwo pod względem metylacji winny wykazywać akcesje, które są bardziej zbliżone genetycznie. Proszę o wyjaśnienie, czy przeprowadzona analiza uwzględniała ten fakt. Jeżeli nie, to jaki to może mieć wpływ na wnioskowanie? Czy można zaplanować taką analizę, która pokazałaby grupowanie profili metylacji po usunięciu wpływu podobieństwa genomów?
4. Identyfikacja związków jest kluczowym krokiem analizy metabolomu. Proszę o uściślenie, jaką metodą była robiona identyfikacja w pracy II.2 – opis jest nieco inny w publikacji („MS peaks to pathway algorithm”) i w autoreferacie (baza danych MzedDB).
5. W opublikowanych danych stwierdziłem: brak podania obserwacji zmiennych środowiskowych wykorzystanych w modelu Maxent w publikacji II.1; niezbyt przystępny opis danych metabolomicznych w pracy II.2, Supplementary Table S1. Takie elementy mają wpływ na możliwości weryfikacji wyników i ich użycia w innych analizach.

6. W publikacji II.1, w opisie metod dla analizy SNP, jest błąd polegający na określeniu plików VCF jako opisujących całe sekwencje genomowe. Pliki VCF zawierają tylko informacje o polimorfizmie.

7. W publikacji II.1 w opisie Ryciny S2 napisano „The ellipses define 95% confidence intervals for each group”. Nie jest to precyzyjne określenie, gdyż przedział ufności można podać dla parametru rozkładu zmiennej, np. dla wartości oczekiwanej (średniej), nie zaś dla „grupy”. Jaki to był parametr?

5. Konkluzja

Recenzowana praca prezentuje bardzo wysoki poziom naukowy i zawiera istotne nowe wyniki w zakresie wiedzy o gatunku *Brachypodium distachyon*. Ze względu na to, że stanowi on gatunek modelowy dla badań nad szeregiem gatunków spokrewnionych, także uprawnych, rezultaty są ważne dla rozwoju badań w zakresie biologii roślin. Przedstawione badania były realizowane w szerokiej współpracy, także międzynarodowej – co znacznie podnosi ich wartość. Decydujący wkład Doktorantki w uzyskanie wyników nie budzi wątpliwości. Praca wymagała opanowania szeregu nowoczesnych technik eksperymentalnych oraz kilku procedur analizy danych. Doktorantka wykazała się umiejętnością prowadzenia badań i interpretacji ich wyników.

W związku z tym uważam, że praca spełnia wymagania stawiane przed rozprawami doktorskimi i zgodnie z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Skalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

P. Kweyewski