

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

„Repetitive DNA sequences and the evolution of the *Brachypodium* genus”

autor rozprawy:

mgr Dana Trunova

Wprowadzenie

Repetytywne sekwencje DNA, które kiedyś określano mianem „śmieciowego DNA”, obecnie uznaje się za bardzo istotne ze względu na rolę jaką pełnią w utrzymywaniu integralności genomu, regulowaniu ekspresji genów czy napędzaniu procesów ewolucyjnych. Występują w genomie w układzie powtórzeń tandemowych (jak np. satDNA) i rozproszonych (ruchome elementy genetyczne). Genomy gatunków roślinnych różnią się znacząco obfitością sekwencji repetytywnych, co jest kluczowym czynnikiem wpływającym na różnorodność wielkości genomów roślinnych. W świetle obecnych badań takie zróżnicowanie wielkości genomów roślinnych może być efektem amplifikacji bądź eliminacji sekwencji repetytywnych lub wynikiem duplikacji całego genomu. Co ciekawe, nie ma korelacji między wielkością genomu a złożonością organizmu (tzw. paradoks liczby C). Chociaż początkowo zakładano, że większe genomy odpowiadają większej liczbie genów i większej złożoności, badania porównawcze wykazały znaczne różnice w wielkości genomów między gatunkami, niezależnie od zawartości genów funkcjonalnych. Jednocześnie wskazały, że głównym czynnikiem powodującym ekspansję genomu jest akumulacja ruchomych elementów genetycznych i frakcji satelitarnego DNA. Sekwencje repetytywne ze względu na swoją unikalną charakterystykę polegającą na tym że: (i) mogą mutować w bardzo szybkim tempie, zwłaszcza te zlokalizowane w regionach niekodujących, (ii) różne typy sekwencji repetytywnych ewoluują w różnym tempie oraz (iii) obficie występują w genomie, są doskonałym narzędziem do badania ewolucji gatunków. I w taki ciekawy, a jednocześnie trudny i pracowity nurt badań wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Dany Trunovej, dotycząca analizy sekwencji repetytywnych i ewolucji rodzaju *Brachypodium*. Praca została wykonana w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone pod kierunkiem

Pani doktor habilitowanej Bożeny Kolano, profesora Uniwersytetu Śląskiego i Pani doktor Natalii Borowskiej-Żuchowskiej, pełniącej rolę promotora pomocniczego. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu **NCN PRELUDIUM BIS 2**, przyznanego Pani Profesor Kolano i wpisują się w prace dotyczące wszechstronnej analizy kariotypów roślinnych z wykorzystaniem sekwencji repetytywnych, prowadzone od lat w Zespole Cytogenetyki i Biologii Molekularnej Roślin, w tym przez grupę Pani Profesor Kolano.

Dane formalne rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i ma formę hybrydową tzn. obejmuje wyniki opublikowane w jednym artykule naukowym, w czasopiśmie *BMC Plant Biology*, oraz wyniki nieopublikowane. Wyniki opublikowane jak i nieopublikowane zebrane są w spójnym tematycznie opracowaniu (monografii) z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych. Jako materiały dodatkowe do rozprawy załączono kopię opublikowanego artykułu wchodzącego w skład opracowania oraz oświadczenia autorów o współautorstwie. Z załączonych oświadczeń (5 na 13 autorów pracy, zgodne z wytycznymi zawartymi w wewnętrznych aktach prawnych UŚ) jak i z informacji zawartych w publikacji wynika, że wkład doktorantki w badania przedstawione w opublikowanym artykule był wiodący i merytorycznie znaczący – Doktorantka przeprowadziła analizy bioinformatyczne oraz laboratoryjne, wykonała obserwacje, analizowała i interpretowała wyniki, przygotowywała ilustracje do publikacji, uczestniczyła w przygotowaniu pierwszej i ostatecznej wersji manuskryptu. Zasadniczy tekst monografii obejmuje rozdziały takie jak: wstęp, postawione hipotezy badawcze i cele (zadania) badawcze do ich zweryfikowania, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku angielskim i polskim oraz wykaz wykorzystanych pozycji literaturowych. Rozprawa liczy 102 strony, zawiera 31 rycin i 8 tabel. W przedstawionym opracowaniu Doktorantka odwołuje się do **245** pozycji literaturowych, z czego **aż 121** źródeł pochodzi z ostatnich 10 lat.

Ocena rozprawy

Wstęp (Introduction) do rozprawy stanowi wprowadzenie literaturowe, w którym doktorantka przedstawiła: (i) organizację taksonomiczną rodziny *Poaceae*, w tym rodzaju *Brachypodium* oraz znaczenie gospodarcze traw, (ii) charakterystykę rodzaju *Brachypodium* w kontekście taksonomicznym, cytogenetycznym i ewolucyjnym oraz (iii) opis sekwencji repetytywnych z uwzględnieniem: (1) powtórzeń zlokalizowanych w genomie w układzie tandemowym i rozproszonym, (2) ewolucji sekwencji repetytywnych i ich specyficzności w genomach roślinnych oraz (3) charakterystyki sekwencji repetytywnych w rodzaju *Brachypodium*. Ta część rozprawy zilustrowana jest sześcioma rycinami (głównie zapożyczonych z literatury, z modyfikacjami Doktorantki), trafnie uzupełniającymi tekst w odniesieniu do informacji na temat ewolucji kariotypów *Brachypodium*, klasyfikacji sekwencji repetytywnych w genomach roślinnych, struktury genów 5S i 35S rDNA oraz klasyfikacji

ruchomych elementów genetycznych. Treści przedstawione w tej części rozprawy uważam za właściwie dobrane i wyczerpujące w kontekście tematyki rozprawy doktorskiej. Tekst został przygotowany w oparciu o liczną, w tym najnowszą, literaturę anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych. Wynika z niego, że Doktorantka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki. Może jedyne czego mi brakuje w tej części pracy, dla szybkiego przyswojenia zależności rodzinnych w obrębie traw, to schemat ilustrujący taksonomiczną organizację w rodzinie *Poaceae* z podziałem na kłady i podrodziny i wskazaniem lokalizacji rodzaju *Brachypodium*.

W kolejnym rozdziale (Aims of the thesis) Doktorantka przedstawiła ogólny cel badawczy oraz zdefiniowała hipotezy badawcze, a następnie przedstawiła zadania badawcze (szczegółowe cele badawcze), w ramach których będą weryfikowane sformułowane hipotezy badawcze. W mojej opinii zarówno hipotezy badawcze jak i cele (zadania) badawcze zostały sformułowane prawidłowo i logicznie korespondują z kolejnymi etapami prowadzonych badań.

W rozdziale materiały i metody (Materials and Methods) Doktorantka przedstawiła plan wg którego realizowano badania, charakterystykę wykorzystanych materiałów roślinnych i zastosowane metody badawcze. Plan badań to cenny element tej części rozprawy, bowiem w przystępny sposób porządkuje informacje o kolejnych etapach działań z uwzględnieniem zastosowanych typów analiz/metod badawczych. W badaniach wykorzystano różnorodny materiał roślinny, w sumie 18 akcesji (genotypów) pozyskanych z różnych rejonów geograficznych świata (Europa, Azja, Afryka, Ameryka Północna), materiał ciekawy pod względem cytogenetycznym (diploidy, tetraploidy, heksaploidy, różna liczba chromosomów, różna zawartość genomowego DNA) jak i pod względem biologii rozwoju (gatunki zarówno jednoroczne jak i wieloletnie). W badaniach Doktorantka wykorzystała szereg metod, które obejmowały techniki analizy DNA (izolacja, amplifikacja, klonowanie, hybrydyzacja), mikroskopową analizę chromosomów (preparacja chromosomów mitotycznych, przygotowanie sond DNA do hybrydyzacji, fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, mikroskopowa detekcja miejsc hybrydyzacji) oraz bioinformatyczną analizę sekwencji DNA. Należy podkreślić, że Doktorantka stosowała trudne, często wieloetapowe metody laboratoryjne z zakresu analizy DNA, wymagające dużej precyzji i dbałości o szczegóły techniczne, ale także analizy *in silico*, wymagające dodatkowo innych umiejętności (zawansowanej wiedzy matematycznej) i znajomości narzędzi bioinformatycznych. Tak więc przeprowadzenie zaplanowanych doświadczeń wymagało od Doktorantki bardzo dobrego przygotowania warsztatowego. Rozdział jest przejrzystie napisany i pozwala zapoznać się na wystarczającym poziomie dla zrozumienia opisanych później wyników, z zastosowanymi materiałami roślinnymi i wykonanymi analizami.

Rozdział wyniki (Results) podzielony jest na cztery podrozdziały obejmujące: (1) analizę zależności filogenetycznych w rodzaju *Brachypodium*, (2) analizę porównawczą repetytywnych sekwencji DNA u *B. hybridum* i jego diploidalnych przodków, (3) charakterystykę repetytywnych sekwencji DNA u wybranych gatunków diploidalnych i allopoliploidalnych w rodzaju *Brachypodium* oraz (4) analizę porównawczą frakcji

repetytywnych DNA w kontekście filogenetycznym. W **pierwszej części badań** sekwencje genu jądrowego *Gigantea* (GI), konserwatywnego genu zaangażowanego w kwitnienie fotoperiodyczne, zostały wykorzystane do rekonstrukcji relacji filogenetycznych w obrębie rodzaju *Brachypodium*. Przeprowadzona rekonstrukcja filogenetyczna potwierdziła podział gatunków *Brachypodium* na trzy główne kłady: (i) kład grupujący gatunki allopoliploidalne pochodzące od nieznanego przodka (ii) kład gatunków jednorocznych oraz (iii) tzw. rdzeniowy kład gatunków wieloletnich (diploidów i większości allopoliploidów). Przeprowadzona analiza potwierdziła allopoliploidalne pochodzenie analizowanych poliploidalnych gatunków *Brachypodium*. W **drugiej części badań** Doktorantka skupiła się na analizie porównawczej różnych sekwencji repetytywnych u dwóch różniących się wiekiem ewolucyjnym allotetraploidalnych linii *B. hybridum* i ich diploidalnych przodków tj. *B. distachyon* i *B. stacei*. W tym celu wykorzystwała szeroki pakiet tandemowych jak i rozproszonych sekwencji repetytywnych tj. geny rDNA, sekwencje satelitarnego DNA oraz retrotranspozony typu LTR. Był to **bardzo szeroki zakres analiz** obejmujący wykorzystanie **narzędzi bioinformatycznych** do identyfikacji określonych typów sekwencji w badanych genomach *Brachypodium* jak również złożone techniki laboratoryjne pokazujące/potwierdzające fizyczną lokalizację zidentyfikowanych sekwencji na chromosomach (**FISH**) czy obfitość ich występowania w analizowanych genomach (**southern blot**). Globalna analiza repeatu wykazała m.in., że młodsza ewolucyjnie linia *B. hybridum* charakteryzowała się podobną obecnością retrotranspozonów LTR jak *B. distachyon* a starsza ewolucyjnie linia *B. hybridum* wykazywała podobieństwo w tym zakresie do *B. stacei*. W ujęciu filogenetycznym interesujące jest przeanalizowanie liczby loci i chromosomowej lokalizacji genów rybosomalnego RNA (5S i 35S rDNA) jak również ich struktury w oparciu o sekwencje, odpowiednio, NTS oraz ITS i IGS. Bardzo ciekawym było zidentyfikowanie frakcji DNA satelitarnego specyficznych dla obu gatunków ancestralnych (rodzina satDNA 156-157 bp; rodzina satDNA 1800 bp), zweryfikowanie ich obecności w pochodzących od nich allotetraploidach *B. hybridum*, jak również zidentyfikowanie sekwencji satelitarnych specyficznych tylko dla poszczególnych linii *B. hybridum* (np. rodzina satDNA 118 bp) oraz określenie fizycznej lokalizacji jednej z nich (rodzina satDNA 156-157 bp) na chromosomach badanych gatunków. Kolejnym ciekawym pakietem wyników wygenerowanym dla dwóch linii *B. hybridum* i ich diploidalnych przodków była bioinformatyczna identyfikacja najważniejszych rodzin retrotranspozonów LTR i analiza ich dynamiki ewolucyjnej. Dodatkowo, najbardziej obficie występujące w genomach rodziny retrotranspozonów LTR typu Ty3/*gypsy* (tj. CRM, Tekay, Tat/Retand) zostały fizycznie zlokalizowane na chromosomach za pomocą FISH. Podsumowaniem tej części badań jest **analiza porównawcza repeatu** u allotetraploidalnych linii *B. hybridum*, która wskazała na ciekawe trendy ewolucyjne w dystrybucji analizowanych sekwencji repetytywnych. **Trzecia część badań** była poświęcona charakterystyce najważniejszych typów sekwencji repetytywnych w obrębie rodzaju *Brachypodium*, uwzględniającej zarówno obiekty jedno- jak i wieloletnie oraz gatunki diploidalne jak i allopoliploidalne. Do tych analiz Doktoranta wybrała szeroki zestaw sekwencji repetytywnych, a mianowicie: (1) 5 rodzin satelitarnego DNA w tym sekwencje centromerowo-specyficzne oraz gatunkowo- i genotypowo-specyficzne; (2)

sekwencje 5S rDNA oraz (3) 13 rodzin retrotranspozonów LTR. Ta część badań także łączyła pracochłonne analizy bioinformatyczne z pracochłonnymi analizami laboratoryjnymi (FISH, southern blot) i została podsumowana porównawczą analizą składu repeatu w obrębie rodzaju *Brachypodium* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych. **Ostatnia część badań** to analiza porównawcza frakcji repeatu pokazująca na wykreślonych drzewach filogenetycznych **ewolucję wybranych rodzin sekwencji satelitarnych** u (1) diploidalnych i (2) wszystkich badanych gatunków *Brachypodium*.

Dyskusja (Discussion) obejmuje 10 stron tekstu, jedną rycinę i jest podzielona na dwa podrozdziały odnoszące się do: (1) filogenezy i ewolucji podstawowej liczby chromosomów oraz (2) organizacji repetytywnych sekwencji DNA w allotetraploidzie *B. hybridum*. Stanowi ona właściwe uzupełnienie i komentarz do sekcji opisującej wyniki przeprowadzonych eksperymentów, umieszczając je w szerszym kontekście. Jest ciekawie napisana i starannie zorganizowana.

Wnioski (Conclusions) to zbiór ośmiu prawidłowo sformułowanych punktów zestawiających najważniejsze informacje z przeprowadzonych badań i odpowiadających postawionym zadaniom (celom) badawczym.

Streszczenia w j. angielskim i polskim właściwie podsumowują zakres prac oraz najważniejsze obserwacje poczynione przez Doktorantkę.

Ostatni rozdział rozprawy doktorskiej to Spis literatury (References), w którym wylistowano aż 245 pozycji zacytowanych w manuskrypcie. Jest to bardzo wartościowe zestawienie piśmiennictwa z zakresu prowadzonych badań i świadczy o właściwym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do prowadzenia badań i analizy ich wyników.

Najważniejsze osiągnięcia Doktorantki

1. Wszechstronna charakterystyka struktury repeatu w zróżnicowanej populacji gatunków i cytotypów *Brachypodium*
2. Identyfikacja rodzin satelitarnego DNA specyficznych centromero, gatunkowo i genotypowo, które mogą być wykorzystane jako markery cytogenetyczne w identyfikacji kariotypów
3. Wskazanie na trendy ewolucyjne w strukturze i organizacji genów rDNA w powstawaniu allotetraploidów *B. hybridum*
4. Wskazanie trendów ewolucyjnych w powstawaniu satDNA w rodzaju *Brachypodium*

Komentarze do tekstu i pytania do Doktorantki

1. Jak wyglądają genetyczne zasoby *Brachypodium*? Czy jest jakiś centralny ośrodek ich gromadzenia?

2. Skąd pochodzą dane zawarte w tabeli 1 dotyczące liczby chromosomów, ploidalności oraz zawartości jądrowego DNA wykorzystanych w badaniach materiałów roślinnych? Nie znajduję pod tabelą stosownego odwołania do pozycji źródłowej.
3. Ile roślin z danego obiektu wykorzystano w analizach FISH w odniesieniu do każdej sondy? Ile płytek metafazowych analizowano z danej rośliny w odniesieniu do każdej sondy?
4. Zgodnie z zasadą, że każda rycina/tabela powinna być w pełni zrozumiała, bez poszukiwania dodatkowych informacji w tekście, sugerowałabym przed przyszłą publikacją wyników:
 - a. na rycinie 20 oprócz kodów obiektów podać nazwy gatunkowe tak jak to jest na rycinie 21
 - b. w tabeli 7 i 8 oraz na rycinach 21-31 dodatkowo przy nazwie obiektu podać jego ploidalność, liczbę chromosomów i adnotację jednoroczny/wieloletni – to zdecydowanie ułatwi szybszą interpretację danych na rycinach
5. Rycina 30:
 - a. w tekście opisującym rycinę 30 mamy odwołanie do zawartości jądrowego DNA genomu ancestralnego w pg, podczas gdy na rycinie zakresy jądrowego DNA są podane w Mbp co jest pewnego rodzaju niekonsekwencją. Rozumiem, że Doktorantka zdecydowała się na zapis w Mbp aby to lepiej korespondowało z długością sekwencji satelitarnych, wskazanych na rycinie. Proszę Doktorantkę o **krótki** komentarz.
 - b. strzałki pokazujące amplifikację lub redukcję określonych typów sekwencji powinny być ukierunkowane odpowiednio góra/dół (jak to podano w tekście) a nie lewo (amplifikacja)/prawo (redukcja) jak to jest na rycinie, co w moim odczuciu jest mało intuicyjne.

Comments to the text and questions for the PhD student

1. What do *Brachypodium*'s genetic resources look like? Is there a central repository for them?
2. Where does the data presented in Table 1, concerning the number of chromosomes, ploidy, and nuclear DNA content, come from? I cannot find a relevant source reference below the table.
3. How many plants per accession (genotype) were used in FISH analyses for each probe? How many metaphase plates were analyzed per plant/per probe?
4. In accordance with the principle that each figure/table should be fully understandable without the need to search for additional information in the text, I would suggest the following, before publishing the results in the future:
 - a. in Figure 20, in addition to the accession codes, provide the species names as shown in Figure 21

- b. In Tables 7 and 8 and Figures 21-31, in addition to the name of the species, provide its ploidy, number of chromosomes, and annotation annual/perennial – this will definitely facilitate faster interpretation of the data in the figures.
5. Figure 30:
- a. in the text describing Figure 30, there is a reference to the nuclear DNA content of the ancestral genome in pg, while in the figure, the ranges of nuclear DNA are given in Mbp, which is somewhat inconsistent. I understand that the PhD student decided to use Mbp to better correspond to the length of the satellite sequences indicated in the figure. I would like to ask the PhD student for a **brief** comment.
 - b. arrows indicating amplification or reduction of specific sequence types should point upward/downward (as indicated in the text) rather than left (amplification)/right (reduction) as shown in the figure, which I find unintuitive.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Dany Trunovej jest **bardzo obszernym i wartościowym opracowaniem nt. struktury, zróżnicowania oraz dynamiki ewolucyjnej różnych typów sekwencji powtarzalnych w genomach przedstawicieli rodzaju *Brachypodium***, a otrzymane wyniki są oryginalne, bardzo ciekawe i w mojej opinii mają dużą wartość poznawczą. Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych materiałów i metod dla uzyskania zakładanych celów. Zaprezentowane wyniki są ciekawe, bez wątpienia poszerzają dotychczasową wiedzę. Ponadto przedstawiona rozprawa wskazuje na odpowiednie przygotowanie teoretyczne Doktorantki w zakresie prowadzonych badań oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do oceny **rozprawa doktorska Pani mgr Dany Trunovej** pt. „Repetitive DNA sequences and the evolution of the *Brachypodium* genus” **w pełni spełnia wymogi formalne** stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571). Wniosuję zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach **o dopuszczenie Pani mgr Dany Trunovej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**. Jednocześnie, w związku z uzyskaniem przez Doktorantkę oryginalnych i bardzo złożonych wyników badań, które częściowo zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym, **wnoszę o wyróżnienie rozprawy**.

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK