

Rzeszów, 16 sierpnia 2019 r.

Dr hab. inż. Mirosław Tyrka
Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki
Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza
Ul. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Wieremczuk
pt.: „Analiza genetyczna i molekularna nowych genów niewrażliwości na fotoperiod
(*Ppd*) w pszenżytcie”**

wykonanej w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie pod opieką promotora prof. dr hab. Krzysztofa Kowalczyka i
promotora pomocniczego dr Justyny Leśniowskiej-Nowak

Tematyka przedstawionej pracy doktorskiej jest interesująca i przyczynia się długoterminowo do wzrostu konkurencyjności hodowli polskich odmian zbóż poprzez identyfikację i charakterystykę nowych alleli genów związanych z poprawą zdolności adaptacyjnych i wzrostem plonów. Rozwój możliwości genetycznych metod regulowania terminu kwitnienia jest niezwykle istotny wobec zmian klimatu oraz w hodowli heterozyjnej pszenicy i pszenżyta.

Rozprawa doktorska liczy 120 stron i ma strukturę typową dla prac badawczych. Kolejne rozdziały zawierają: przegląd literatury (22 strony), cel pracy oraz opis materiałów i metod (16 stron). Zasadniczą część pracy stanowi liczące 43 strony omówienie wyników. Praca ma przejrzystą strukturę a informacje podawane są w uporządkowany sposób. Pracę kończy dyskusja (10 stron) i właściwie sformułowane wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz obejmujący 17 stron spis literatury zawierający 200 pozycji.

Tytuł jest sformułowany prawidłowo i właściwie określa zawartość pracy. Nie zamieszczono spisu skrótów, który byłby wskazany ze względu na metody analizy DNA omawiane w części przeglądowej. Przegląd literatury przedstawiono jako jednolity rozdział, chociaż zawiera systematyczne omówienie odrębnych zagadnień tj.: rola i znaczenie pszenżyta, historia i aktualne kierunki hodowli pszenżyta, genetyczno-fizjologiczne podstawy terminu kwitnienia u zbóż, efekty plejotropowe genów *ppd* oraz wybrane systemy markerów

genetycznych. W przeglądzie literatury podkreślono szczególną rolę pszenżyta w gospodarce Polski. Historia prowadząca do powstania nowoczesnych odmian pszenżyta została przedstawiona z ciekawymi szczegółami, oraz słusznym podkreśleniem roli polskich firm hodowlanych oraz ośrodków naukowych (UP w Lublinie i IHAR w Radzikowie). Kierunki hodowli omówiono syntetycznie i przy omawianiu wartości wypiekowych pszenżyta trochę zabrakło prac prof. Adama Łukaszewskiego. Omówienie roli terminu kwitnienia bardzo wprowadza w główne zagadnienia poruszane w rozprawie. Geny wpływające na termin kwitnienia u zbóż zostały omówione wyczerpująco natomiast ze względu na wspomniane ortologie genów zabrakło mi schematu pokazującego wzajemne interakcje pomiędzy czynnikami determinującymi termin kwitnienia u *Arabidopsis* lub jęczmienia. Szczegółowo przedstawiono dane o lokalizacji i roli genów wernalizacji, wrażliwości na fotoperiod i wczesności *per se* u pszenicy i żyta. Zarysowano rolę cytochromów i fitochromów w odbieraniu i reakcji na fotoperiod.

W trakcie lektury przeglądu nasunęły mi się następujące pytania. Czy można jakoś wyjaśnić, że w warunkach dnia krótkiego allel dominujący *Ppd-1* przyspiesza kwitnienie u pszenicy a u jęczmienia jest nieaktywny (str. 16). Co stanowi sygnał generowany na bazie genu *TaFT1* transportowany do merystemów kwiatowych? Przy omawianiu metody DArT (str. 26) wydaje się, że system detekcji markerów DArT przedstawiono w trochę niejasny sposób a to raczej przypomina typową technikę mikromacierzową w której znakowane fluorescencyjnie badane DNA jest hybrydyzowane do immobilizowanych nieznakowanych sond. Całość przeglądu jest podbudowana licznymi odnośnikami literaturowymi. Doktorantka w wyczerpujący i rzeczowy sposób wprowadziła w tematykę pracy.

W dalszej części zdefiniowano 6 celów pracy obejmujących m.in. identyfikację genu niewrażliwości na fotoperiod, określenie sposobu jego dziedziczenia, związku z wybranymi cechami ilościowymi, analizę porównawczą sekwencji i identyfikację markerów DArTseq sprzężonych z tym genem w badanej populacji pszenżyta. W kolejnym rozdziale „Materiał i metody” przedstawiono materiały badawcze i linie referencyjne. Z opisanego procesu uzyskiwania komponentów rodzicielskich z uwzględnieniem spontanicznej diploidyzacji mieszańca Clever x (*Amilo* x *Dasypyrum villosum*) wynika, że będzie miał uproszczony skład genomowy AABBDDRR, po krzyżowaniu z pszenicą Nadobna (AABBDD) wygląda na to że genom R będzie eliminowany. Czy w badaniach DArTseq uzyskiwano markery adnotowane do wszystkich chromosomów z 4 genomów? W tabeli 1 wskazane byłoby uzupełnić informacje o genach Ppd obecnych w materiałach referencyjnych. Przedstawiono bardzo dokładny opis metod statystycznych wraz ze ścieżkami analizy w programie Statistica. Dla sekwencji użytych

do projektowania starterów powinny być podane numery w bazie NCBI, co pozwoliłoby na sprawdzenie poprawności realizacji tego etapu. Przy opracowaniu danych z DArTseq wykorzystano tylko część możliwości tj. analizę asocjacyjną – pozostała do wykorzystania mapa genetyczna i analiza ilościowa QTL – która pozwoliłaby na weryfikację adnotacji markerów i dałaby informacje o konstrukcji genetycznej populacji.

W omówieniu wyników wprowadzono klasyfikację roślin do podklas wczesności i wykorzystano test χ^2 do określenia sposobu dziedziczenia wczesności kwitnienia w badanej populacji. Dla większości badanych cech stwierdzono rozkład obiegający od normalnego. Na podstawie korelacji z terminem kwitnienia stwierdzono negatywną lub nieistotną zależność pomiędzy terminem kwitnienia (obecność genu Ppd) a długością pędu głównego i osadki kłosowej, liczbą kłosek i ziarniaków w kłosie głównym oraz ich masą. Znalazło to również przełożenie na obliczone parametry płodności kłoska i masy tysiąca ziaren o negatywnej lub nieistotnej korelacji z terminem kwitnienia oraz zbitości kłosa o pozytywnej korelacji. Ta część omówienia wyników może być bardziej syntetycznie przedstawiona. Uzupełnienia mogą wymagać ryciny 3-18, na których brakuje skali i jednostek.

W następnej części pracy porównano zmienność badanych cech jakościowych w grupach późnych, wczesnych i formach rodzicielskich. Liczebność roślin w populacjach jest różna dla badanych cech i wydaje się, że powinna być powiązana z liczebnością określoną na etapie badania dziedziczenia. Podobnie formy rodzicielskie nie powinny być włączone do jednej grupy bo wtedy trudno znaleźć osobniki z transgresją. Tabele z danymi o istotności różnic pomiędzy grupami zawierają dwukrotnie te same informacje i mogą zostać częściowo połączone ze sobą z podaniem różnic dla F2 i F3 w różnych częściach tabeli. Do celów publikacji wyniki zawarte w tym podrozdziale można przedstawić bardzo syntetycznie. Przeprowadzona analiza pozwoliła statystycznie powiązać zmiany cech ilościowych z wczesnością badanych roślin.

W ostatniej części wyników przedstawiono analizy DNA genów Ppd. Stosując startery dla *Ppd-B1a* uzyskano amplifikację wyłącznie w linii Późny 3. Z kolei z analizy genu *Ppd-D1a* wynika, że nie występuje m.in. w tej linii. Jak to można wyjaśnić biorąc pod uwagę pochodzenie tej linii i fakt, że obie pszenice w rodowodzie nie różnią się pod względem tych genów? Po optymalizacji oznaczeń uzyskano markery świadczące o tym, że oba komponenty rodzicielskie zawierają sekwencje amplifikowane po zastosowaniu starterów bazujących na genach *Ppd-D1a* i *Ppd-B1a*. Czy w takim wypadku analizy materiałów referencyjnych nie powinny być powtórzone w zoptymalizowanych warunkach? Brakuje wyników dla pozostałych zaprojektowanych starterów – co pozwoliłoby uzyskać informację czy

komponenty były homozygotyczne pod względem genów Ppd. Uzyskane fragmenty genów *Ppd-D1a* i *Ppd-B1a* zsekwencjonowano i porównano z wybranymi sekwencjami z bazy NCBI i zidentyfikowano mutacje. Ryciny 31 i 32 odnoszą się do tego samego genu. Trudno powiedzieć, czy stwierdzone mutacje wpływają na funkcję badanych genów ponieważ, zidentyfikowane zmiany z genu *Ppd-B1a* z linii Wczesny 1 są takie same w porównaniu do obu alleli *Ppd-B1a* i *Ppd-B1b* w bazie NCBI. Czy można wykluczyć, że sekwencja fragmentu genu *Ppd-D1a* z rodzica Późny 3 nie pochodzi od żyta lub *Dasypyrum villosum*?

W pracy przeprowadzono również analizę DArT i uzyskano ponad 34 tysiące markerów. Wyniki te wykorzystano jedynie w analizie asocjacyjnej co pozwoliło na wybór 7 sekwencji (sekwencje 2 i 4 wyglądają identycznie). Uzupełnienia wymaga efekt związany z występowaniem danego wariantu markera, informacja do czego odnosi się podana pozycja na chromosomie. W sumie zidentyfikowano kilka sekwencji i nie wiadomo teraz, czy odnoszą się do jednego czy większej liczby loci. Uzyskane dane DArT mogą być też wykorzystane do charakterystyki komponentów rodzicielskich i wstępnego określenia ich konstrukcji genetycznej, oraz mapy genetycznej analizowanej populacji.

W dyskusji szeroko omówiono efekty plejotropowe związane z obecnością genów *Ppd-D1a*, *Ppd-B1a* i *Ppd-A1a*. Efekty obecności tych alleli w pszenicy były korzystne i przyczyniały się do wzrostu plonu. Wpływ genów Ppd na poszczególne komponenty plonu omówiono w uporządkowany sposób. Interpretacja wyników sekwencjonowania genów Ppd nie jest przejrzysta. Produkty PCR ze starterami *Ppd-B1a* różnią rodziców natomiast nie pokazano podobieństwa tych produktów do genu *Ppd-B1a* a jedynie *Ppd-B1b*. Wydaje się, że bezpiecznym rozwiązaniem byłoby uzupełnienie tych analiz o inne publikowane markery dla genów *Ppd-1B*, żeby uzyskać potwierdzenie czy komponenty różnią się funkcjonalnie w tym locus. Jeśli niewrażliwość na fotoperiod w locus *Ppd-B1a* jest wynikiem zmian w liczbie kopii genu to standardowa metoda PCR nie pozwoli na zdiagnozowanie tego genu i bardziej odpowiednim narzędziem byłaby metoda qPCR. Opis na stronie 97 w zdaniu „Pierwszą zmianą był SNP ...” wymaga poprawy bo SNP nie może być aż tak dużą insercją. W dyskusji omówiono wiele markerów genu *Ppd-B1* – ich włączenie do pracy byłoby korzystne. Analiza asocjacyjna wymaga rozwinięcia o charakterystykę struktury populacji. Wybór sekwencji specyficznych dla wybranej puli genotypów jest najprostszym rozwiązaniem jednak wskazanej jest uzupełnienie analiz o informacje o efektach i istotności. Praca jest napisana starannie i błędy edytorskie są nieliczne.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Aleksandry Wieremczuk należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej i nowoczesnej metodyki, co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji pracy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim w Artykule 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Wieremczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

/Miroslaw Tyrka/

