

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Ewy Borzęckiej

***pt. Wykorzystanie biblioteki BAC do integracji map fizycznych i genetycznych
oraz identyfikacji genów związanych z udomowieniem i odpornością na choroby żyta***

W ostatnich latach odnotowujemy szybki rozwój metod i strategii badawczych stosowanych w genomice, coraz szerzej również dla niemodelowych gatunków roślin uprawnych. Szczególnie interesujący wydaje się trend badań pan-genomów, wykraczający poza prosty opis struktury genomu badanego gatunku, zmierzający do globalnej identyfikacji wariantów genetycznych różnicujących genomy w obrębie gatunku. Ilość i jakość zasobów genomicznych dostępnych dla określonego gatunku zależy przede wszystkim od nakładów finansowych możliwych do uzyskania w celu realizacji ambitnych projektów badawczych (w przypadku gatunków niemodelowych jest to bezpośrednio uzależnione od ich znaczenia gospodarczego), ale również od stopnia złożoności genomu, czyli jego wielkości i poziomu ploidalności. Żyto jest diploidem o dość dużym genomie (ok. 8 Gpz) i, do niedawna, bardzo ograniczonych zasobach genomicznych. Dopiero w roku 2021 opracowano pierwsze złożenia genomów referencyjnych żyta. Można zatem stwierdzić, że na etapie planowania pracy doktorskiej przyjęto właściwe założenia, których realizacja w istotny sposób poszerzyła wiedzę na temat genomu żyta. Badania były prowadzone w ramach projektu finansowanego przez NCN oraz grantu Dziekana Wydziału Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu SGGW.

W przedstawionej do recenzji rozprawie Autorka opisała wyniki badań mających na celu powiązanie klonów BAC żyta, z biblioteki uzyskanej dla linii L318 we wcześniejszym projekcie, z mapą genetyczną tego gatunku. Wykorzystując rezultaty integracji klonów BAC z mapą genetyczną Autorka podjęła następnie próbę identyfikacji genów istotnych dla udomowienia żyta oraz jego odporności na choroby. Zarysowana problematyka badawcza ma zatem znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Przyjęta strategia badań wymagała opracowania oryginalnych metodyk i dużego nakładu pracy, zarówno na etapie eksperymentów w laboratorium, jak również bioinformatycznej analizy uzyskanych wyników.

Struktura pracy

Praca w formie monografii obejmuje 135 stron maszynopisu z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych.

Streszczenia w języku polskim i angielskim właściwie charakteryzują założenia pracy i prezentują najważniejsze osiągnięcia uzyskane w toku realizacji badań do pracy doktorskiej.

Wstęp, cel pracy i hipotezy badawcze zostały zgromadzone w jednym rozdziale, który stanowi syntetyczne wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej i sygnalizuje wszystkie istotne zagadnienia stanowiące podstawę przeprowadzonych badań, a następnie zwięźle i precyzyjnie przedstawia cel ogólny oraz cele szczegółowe w formie pięciu punktów, a także cztery weryfikowane przez Doktorantkę hipotezy badawcze. Ponieważ praca w dużej części jest związana z opracowaniem nowych metod badawczych, trzy pierwsze hipotezy mają charakter techniczny i odnoszą się do możliwości wykorzystania określonych strategii eksperymentalnych do analiz genomu żyta.

W kolejnym rozdziale, Przeglądzie literatury, obejmującym 28 stron maszynopisu Autorka w pierwszych podrozdziałach omówiła żyto jako gatunek uprawny, strukturę jego genomu oraz znane geny determinujące ważne użytkowo cechy żyta. W następnej sekcji opisała ważne dla badań genomicznych narzędzie, jakim są biblioteki BAC, ich przydatność do identyfikacji genów i możliwości ich wykorzystania jako sond w badaniach cytogenetycznych. Wskazała również na znaczenie procedury kotwiczenia klonów BAC na mapach genetycznych, popierając to licznymi dobrze opisanymi przykładami. Kolejna sekcja przeglądu literatury dotyczy znaczenia metod sekwencjonowania następnej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*, co Doktorantka nieprecyzyjnie tłumaczy jako „sekwencjonowanie nowej generacji”). W tej sekcji przedstawiła Ona krótką charakterystykę najważniejszych technologii NGS oraz przykłady ich zastosowania w genomice roślin, w tym możliwość wykorzystania NGS do genotypowania roślin w oparciu o sekwencjonowanie bibliotek o zredukowanej złożoności genomowej, ogólnie określanych jako genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS, ang. *genotyping-by-sequencing*). Jeden z wariantów tej strategii, metoda DArTseq, stanowiła podstawowe narzędzie wykorzystane w pracach eksperymentalnych opisanych w dysertacji. Ostatnia sekcja przeglądu literatury dotyczy zagadnień związanych z udomowieniem roślin uprawnych, wpływem udomowienia na genom oraz genów związanych z tzw. syndromem udomowienia, a także genów odporności na choroby.

Materiały i metody zostały szczegółowo opisane w kolejnym rozdziale, na dziesięciu stronach opracowania. Uważam, że złożona strategia konstruowania prób łączonych klonów BAC wykorzystana w badaniach mogłaby zostać czytelniej zaprezentowana w formie ryciny uzupełniającej lub zastępującej Tabelę 1. Kolejne etapy zostały czytelnie zaprezentowane, a pytania merytoryczne dotyczące metod umieściłem w dalszej części recenzji.

Wyniki wraz z dokumentacją (17 tabel, 13 rycin oraz Aneks zamieszczony w rozdziale 8) obejmują 25 stron (oraz 11 stron aneksu) i tym samym stanowią zasadniczą część pracy. Otrzymane rezultaty badań są logicznie uporządkowane, czytelnie przedstawione i poparte właściwie dobranym materiałem ilustracyjnym. Obejmują one podrozdziały opisujące wyniki genotypowania prób łączonych klonów BAC metodą DArTseq, kotwiczenia klonów BAC do map genetycznych, weryfikację właściwego przyporządkowania markerów do klonów BAC, sekwencjonowanie klonów BAC w technologii Oxford Nanopore oraz próbę identyfikacji genów warunkujących odporność na choroby żyta i genów związanych z udomowieniem tego gatunku.

Dyskusja obejmuje 19 stron i jest bardzo dobrym komentarzem do sekcji opisującej wyniki przeprowadzonych eksperymentów, umieszczając je w szerszym kontekście. Podobnie jak pozostałe części rozprawy, została ona zorganizowana starannie i w przemyślany sposób.

Wnioski to zbiór sześciu punktów stanowiących poprawną rekapitulację wyników przeprowadzonych eksperymentów. Zgodnie ze sformułowanymi celami szczegółowymi i hipotezami badawczymi, wskazują one na przydatność wykorzystanych metod i technik do badań genomicznych żyta. Wniosek 5. dotyczy prawdopodobnej roli genu *Sck33* w odpowiedzi na porażenie żyta rdzą brunatną. Mimo ostrożnego sformułowania tego wniosku, jedyną przesłanką wynikającą z prac eksperymentalnych na jego poparcie była zmiana profilu ekspresji tego genu w odpowiedzi na infekcję – jak wskazano w wynikach, jego rzeczywista rola musi jeszcze zostać potwierdzona, więc wniosek ten uważam za zbyt daleko idący.

Spis literatury obejmuje ponad 250 pozycji. Wykorzystany przez Autorkę zestaw publikacji niewątpliwie świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia badań.

Rozprawa zawiera również oświadczenia Doktorantki i Promotorki pracy doktorskiej, informacje o źródłach finansowania badań, spis treści i wykaz skrótów.

Merytoryczna ocena pracy

Dysertacja przygotowana przez Panią mgr Ewę Borzęcką dotyczy wykorzystania nowatorskich metod analiz genomicznych w celu lepszego poznania genomu żyta i wypracowania możliwości identyfikacji ważnych genów determinujących cechy użytkowe oraz genów biorących udział w reakcji rośliny na porażenie patogenami. Jest to obszar nauki, w którym postęp technologiczny i przyrost wiedzy zachodzą bardzo szybko, czego odzwierciedleniem jest fakt, że Doktorantka zaczynała swoją pracę w okresie, kiedy nie dysponowano jeszcze złożeniem genomu referencyjnego żyta, a kończyła ją już kiedy dwa takie złożenia były dostępne. Strategia polegająca na kotwiczeniu klonów BAC na mapach genetycznych wniosłaby fundamentalny postęp w badaniach genomu żyta w sytuacji braku genomu referencyjnego, natomiast obecnie jej znaczenie może wydawać się nieco mniejsze. Jednakże w mojej opinii opracowane zasoby w dalszym ciągu stanowią istotne poszerzenie dostępnych możliwości analizy genomu żyta, w szczególności z uwagi na fakt, że linia wykorzystana do konstrukcji biblioteki BAC jest genetycznie odrębna od linii, dla których skonstruowano złożenia genomów. Zarówno zastosowanie skutecznej strategii kotwiczenia klonów BAC, jak również wykorzystanie technologii Oxford Nanopore do ich sekwencjonowania stanowią znaczące osiągnięcia, a uzyskane wyniki, w powiązaniu z dostępnością genomów referencyjnych mogą w przyszłości pozwolić na rozwinięcie podejścia pan-genomicznego w kontekście badań na żytem. Zakotwiczenie ponad 4,5 tys. klonów BAC przy pomocy prawie 5,5 tys. markerów DArTseq to znaczący postęp wskazujący na wysoką skuteczność zaproponowanego podejścia metodycznego. Na podstawie sekwencjonowania 13 klonów BAC wykazano również, że technologia Oxford Nanopore pozwala na uzyskanie ciągłej sekwencji takich klonów. Powiązanie sekwencji klonów BAC z sekwencjami referencyjnymi pozwala również na bardziej wydajną identyfikację i analizę genów odporności i genów udomowienia żyta.

Jak przedstawiłem powyżej, moja ocena badań zrealizowanych przez Doktorantkę jest wysoka, tym niemniej, chciałbym w tym miejscu sformułować kilka pytań dotyczących zastosowanej metodyki: (1) str. 46; dlaczego przy wiązaniu markerów DArTseq z klonami BAC zastosowano parametry 75% podobieństwa i 75% długości sekwencji – kryteria te wydają się mało selektywne, czy próbowano wykorzystać bardziej surowe warunki kotwiczenia? (2) str. 47; dlaczego podczas przygotowania DNA z klonów BAC do sekwencjonowania w technologii

Oxford Nanopore poddawano je fragmentacji? (3) str. 49, na czym polegała „analiza funkcjonalna sekwencji klonów DArT”? – wydaje mi się, że takie stwierdzenie jest daleko idącym skrótem myślowym.

W rozdziale Wyniki moją wątpliwość wzbudziło stwierdzenie, że badane klony BAC stanowiły 65% genomu żyta. Uważam, że proste zsumowanie długości wszystkich klonów powoduje, iż ta wartość jest przeszacowana, ponieważ część klonów BAC zawierała nakładające się na siebie sekwencje (na co wskazuje obecność markerów DArTseq przypisanych do więcej niż jednego klonu BAC). Zastanawiam się również, czy błędy odczytu sekwencji uzyskanych w technologii Oxford Nanopore w stosunku do sekwencji referencyjnej można nazywać „polimorfizmami”, „substytucjami”, „InDelami” (str. 60-61) czy też „mutacjami” (str. 85) – wszystkie te pojęcia posiadają precyzyjny sens biologiczny, a w tym wypadku sugerowałbym pozostanie przy terminie „błąd odczytu sekwencji”.

W pracy pojawiły się również drobne niedoskonałości wymagające korekty. Poza niedociągnięciami wspomnianymi w pierwszej części recenzji chciałbym zwrócić uwagę na następujące potknięcia: na str. 33; „efekt szyjki butelki” to kalka z angielskiego, powinno być „efekt wąskiego gardła”; na str. 36; „invertaza ściany komórkowej” to zapewne cel-wall invertase, czyli „invertaza zlokalizowana w ścianie komórkowej”; na str. 64 w opisie ryc. 6 i kolejnych rycin; „fragment poliadenylowy”, powinno być „sygnał poliadenylacji”, następnie „start transkrypcji (sekwencja TATA)” – zwracam uwagę, że miejsce inicjacji transkrypcji (TSS, ang. *transcription start site*) nie pokrywa się z sekwencją TATA.

Podsumowanie

Przedstawioną mi do oceny pracę oceniam wysoko. Wskazuje ona na bardzo dobry poziom przygotowania Autorki do prowadzenia badań z zakresu genomiki roślin, łączącej metody eksperymentalne z analizami bioinformatycznymi. Podjęta przez Autorkę tematyka posiada również znaczenie aplikacyjne, a uzyskane wyniki mogą w przyszłości wspomóc hodowlę nowych odmian żyta o lepszych parametrach użytkowych i odporności na choroby.

Oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone na podstawie Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668, z późn. zm.). W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Ewy Borzęckiej w dyscyplinie nauk biologicznych oraz Jej

umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Ewy Borzęckiej do dalszych etapów procedury doktoranckiej.

Kraków, 23 września 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dariusz Grzebelus'.

prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus