

dr hab. Edyta Paczos-Grzęda, prof. uczelni
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Lublin, 23.09.2022 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani magister Ewy Borzęckiej

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

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 14.07.2022 r. w oparciu o wymagania określone w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1669, z późn. zm.).

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Borzęckiej została zrealizowana pod kierunkiem Pani dr hab. Hanny Bolibok - Brągoszewskiej, profesora SGGW w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW w Warszawie. Badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego pt. ”Wpływ selekcji na genom rośliny uprawnej - identyfikacja i charakterystyka sekwencji, na które nakierowana była presja selekcyjna w trakcie udomowienia i hodowli żyta (*Secale cereale* L.)” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, nr UMO 2014/14/E/NZ9/00285 oraz grantu Dziekana WOBiAK na prowadzenie badań naukowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich SGGW pt.: ”Wstępna charakterystyka strukturalna nowych genów potencjalnie związanych z odpornością na choroby u żyta” nr 505-10-041000-P00286-99).

Rozprawę doktorską mgr Ewy Borzęckiej stanowi monografia naukowa. Praca liczy 135 stron. Została zredagowana w sposób typowy dla tego typu opracowań, niemniej jednak wprowadzono pewne zmiany w porównaniu ze stosowanym zazwyczaj układem rozdziałów. Zmiany te uważam za korzystne i warte naśladowania, gdyż ułatwiają czytanie i analizę pracy. Na początku rozprawy umieszczono streszczenia i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim. Należy zaznaczyć, że streszczenie jest zwarte, klarowne i zawiera wszystkie niezbędne informacje, zaś wersja w języku polskim odpowiada wersji w języku angielskim.



Następnie zamieszczono spis treści. Praca składa się z dziewięciu rozdziałów, z których każdy jest podzielony na szereg podrozdziałów. Rozdział 1 stanowi wykaz skrótów. Rozdział 2 (Wstęp, cel pracy i hipotezy badawcze) obejmuje 2 strony i zawiera podstawowe informacje na temat żyta oraz jego genomu, a także wyodrębniony cel ogólny i cele szczegółowe oraz listę hipotez badawczych. Rozdział 3 (Przegląd literatury) liczy 27 stron i przedstawia wszechstronną charakterystykę żyta ze szczególnym uwzględnieniem jego genomu, genów związanych z udomowieniem gatunku i odpornością na choroby, a także charakteryzuje biblioteki BAC i sekwencjonowanie nowej generacji. Rozdział 4 (Materiały i Metody) obejmuje 10 stron i 14 podrozdziałów. Opisuje biblioteki BAC, pulowanie klonów, izolację DNA, genotypowanie, sekwencjonowanie, analizy bioinformatyczne i qPCR. Rozdział 5 (Wyniki) na 25 stronach w 6 podrozdziałach z 10 rysunkami i 17 tabelami prezentuje wyniki eksperymentów. Rozdział 6 (Dyskusja) obejmuje 19 stron i w sposób syntetyczny, ale wyczerpujący dostarcza interpretacji wyników w oparciu o literaturę. Rozdział 7 (Wnioski) przedstawia listę 6 wniosków sformułowanych w oparciu o uzyskane wyniki. Rozdział 8 stanowi Aneks obejmujący trzy tabele. Pracę kończy rozdział 9 (Literatura) obejmujący 241 pozycji piśmiennictwa, głównie angielskojęzycznego. Podsumowując ocenę metodyczną rozprawy doktorskiej, stwierdzam że jest ona przygotowana prawidłowo.

Obiektem badań prowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej jest żyto (*Secale cereale* L.), a właściwie jego stosunkowo duży i skomplikowany, jak na gatunek diploidalny, genom. Obcopylność żyta warunkująca płodność roślin jest cechą, która dodatkowo utrudnia prace badawcze w tym gatunku. Żyto jest ważną rośliną uprawną w Europie Środkowej i Wschodniej, a jego znaczenie gospodarcze jest szczególnie istotne w Polsce. Przystosowanie żyta do wzrostu w warunkach niekorzystnych dla innych zbóż, duża tolerancja na stresy biotyczne i abiotyczne, a także popyt na ziarno sprawiają, że areał jego uprawy w Polsce utrzymuje się na mniej więcej stałym poziomie. Duże znaczenie tego zboża w kraju przejawia się również wysoką aktywnością naukowców w różnorodnej tematyce badawczej dotyczącej tego gatunku.

Celem rozprawy była integracja map fizycznych i genetycznych żyta oraz identyfikacja genów związanych z udomowieniem i odpornością na choroby przy wykorzystaniu biblioteki BAC linii wsobnej L318. Wykorzystując technologię DArTseq zgenotypowano 16 pul klonów BAC reprezentujących 41% całej biblioteki BAC i 65% genomu żyta (~ 5,2 Gbp), dzięki czemu zakotwiczone klony BAC na mapie genetycznej. Uzyskano 221 122 adresów marker DArTseq-klon BAC. W wyniku zastosowania adnotacji funkcjonalnej sekwencji markerów DArT żyta i sekwencjonowania pojedynczych klonów BAC metodą Oxford Nanopore zidentyfikowano 28 genów przypuszczalnie związanych z odpornością na choroby. Przy pomocy techniki qRT-



PCR wykazano prawdopodobną rolę genu *Sck33* w reakcji na infekcję patogenem *Puccinia recondita* f. sp. *secalis*, powodującym rdzę brunatną żyta. Analizując geny związane z udomowieniem wykazano, że w sześciu klonach BAC znajdują się sekwencje homologiczne do pięciu genów: *Q*, *GIF1*, *BTR2*, *VRN1* i *VRN2*. Ponadto, w pełnych sekwencjach klonów BAC zidentyfikowano 128 przypuszczalnych genów o różnych funkcjach biologicznych. Realizując pracę doktorską uzyskano ogromną ilość informacji o dużym potencjale wykorzystania w dalszych badaniach nad żytem.

W niniejszej rozprawie doktorskiej Pani mgr Ewa Borzęcka postawiła 4 hipotezy badawcze i sformułowała cele badawcze służące ich weryfikacji. Hipotezy zakładały, że: (1) genotypowanie DArTseq w połączeniu z zastosowaniem trójwymiarowej strategii tworzenia pul zbiorczych klonów BAC jest efektywnym sposobem na ustalanie adresów marker DArTseq-klon BAC i kotwiczenie klonów BAC na mapie genetycznej żyta, (2) adnotacja funkcjonalna żytnich markerów DArT i biblioteki BAC linii wsobnej żyta L318 pozwoli na poznanie sekwencji genów związanych z odpornością na choroby, (3) technologia Nanopore umożliwi uzyskanie wysokiej jakości sekwencji klonów BAC oraz (4) w genomie żyta możliwa jest identyfikacja homologów genów udomowienia występujących u innych zbóż.

Celem nadrzędnym niniejszej rozprawy była integracja mapy fizycznej i genetycznej żyta oraz uzyskanie pełnej sekwencji wybranych genów związanych z odpornością na choroby i udomowieniem żyta przy wykorzystaniu biblioteki BAC. Aby zrealizować cel nadrzędny sformułowano cele pośrednie: (1) identyfikacja markerów DArTseq w klonach BAC umożliwiająca ustalenie adresów klon BAC-marker DArTseq, (2) weryfikacja wiarygodności uzyskanych adresów klon BAC-marker DArTseq, (3) integracja mapy fizycznej i genetycznej przy wykorzystaniu adresów klon BAC-marker DArTseq i mapy genetycznej markerów DArTseq, (4) opracowanie metodyki sekwencjonowania klonów BAC technologią Nanopore, (5) zidentyfikowanie klonów BAC zawierających geny związane z odpornością na choroby i udomowieniem.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Borzęckiej uznaje: (1) zgenotypowanie z wykorzystaniem technologii DArTseq 16 pul klonów BAC reprezentujących 41% całej biblioteki BAC i 65% genomu żyta (~ 5,2 Gbp). (2) uzyskanie ponad 200 tys. adresów marker DArTseq-klon BAC i zakotwiczenie klonów BAC na mapie genetycznej, (3) wdrożenie technologii Oxford Nanopore do sekwencjonowania pojedynczych klonów BAC (4) identyfikację 28 genów przypuszczalnie związanych z odpornością na choroby, w tym genu *Sck33*, którego prawdopodobną rolę w reakcji na zakażenie patogenem *Puccinia recondita* f. sp. *secalis*, powodującym rdzę brunatną potwierdzono przy pomocy techniki qRT-PCR (5) identyfikację sekwencji homologicznych do pięciu genów związanych z udomowieniem: *Q*,

GIF1, BTR2, VRN1 i VRN2 oraz 128 przypuszczalnych genów o różnych funkcjach biologicznych w pełnych sekwencjach klonów BAC. Uzyskane wyniki przedstawiają ogromną wartość poznawczą. Jak słusznie stwierdza doktorantka, wyniki te stanowią punkt wyjścia do dalszych badań m.in. nad funkcją zidentyfikowanych genów. Jednocześnie należy podkreślić, że w pracy wygenerowano ogromną ilość informacji, które będą mogły być wykorzystane w dalszych pracach nad żytem. Wartość merytoryczna i poznawcza pracy jest bardzo wysoka.

Z obowiązku recenzenta odnotowałam kilka uwag dotyczących rozprawy doktorskiej:

1. W rozprawie nie udało się uniknąć błędów, głównie stylistycznych i interpunkcyjnych. Użyto sformułowań, w moim mniemaniu niepoprawnych, takich jak: plon mąki, wysokość kłosa, reakcja na patogena, gen produkcji chleba, przemiana dzikiej trawy czy odporność na aluminium. Szczególnie w przeglądzie literatury pojawiło się wiele zdań, których zrozumienie wymagało kilkakrotnego przeczytania i dokładnej wcześniejszej znajomości zagadnienia np. W tej technologii próbki amplikowane są w bliskim sąsiedztwie poprzez tzw. „wzmocnienie mostka na powierzchni stałej” za pomocą mikroprzepływowej stacji klastrowej. Nie umniejsza to jednak w żaden sposób wartości merytorycznej pracy.
2. Dobór publikacji omówionych w przeglądzie literatury jest bardzo dobry, jedynie w rozdziale trzecim dotyczącym sekwencjonowania brakuje najnowszych pozycji z tego zakresu. Niestety informacje zawarte w przeglądzie literatury miejscami są bardzo chaotyczne, dane zagadnienie nie jest opisywane w kolejno następujących po sobie akapitach, ale informacje przerywane są dygresjami dotyczącymi zupełnie innego tematu. Sprawia to trudności w płynnym czytaniu i rozumieniu tekstu.
3. W metodyce bardzo często brakuje szczegółowych informacji, co sprawia, że rozdział, który powinien umożliwiać powtórzenie eksperymentów i analiz prowadzonych przez Doktorantkę nie spełnia swojej roli, dotyczy to na przykład rozdziału 4.4 gdzie trudno zorientować się w objętościach kultury bakteryjnej, czy 4.3 i 4.4 gdzie nie wiadomo do jakiego stężenia doprowadzano próbki, czy rozdziału 4.5, w którym bez znajomości technologii DArTseq nie jest możliwe zrozumienie tej części eksperymentu. Opis w rozdziale 4.6 jest również niejasny. To samo dotyczy rozdziału 4.14, z którego nie wynika jakie sekwencje starterów wykorzystano w ilościowym PCR. Wiele wątpliwości ulega wyjaśnieniu w trakcie czytania rozdziału Wyniki, jednak to rozdział dotyczący metodyki powinien dostarczać tych informacji oraz stanowić zrozumiałą i zamkniętą całość.
4. W moim odczuciu najlepiej napisany jest rozdział Wyniki i częściowo rozdział Dyskusja. Widać w nich zaangażowanie Doktorantki w prowadzone prace i zrozumienie

podejmowanej problematyki. Niemniej jednak dyskutowanie uzyskanych przez Doktorantkę wyników w kontekście badań innych autorów, a szczególnie w szeroko pojętym kontekście biologicznym, jest tym co można w przyszłości poprawić jeśli wyniki uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej będą publikowane.

Podkreślam raz jeszcze, że zauważone przeze mnie błędy lub niedociągnięcia są mało znaczące i nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię na temat rozprawy.

W trakcie obrony chciałabym usłyszeć od Kandydatki odpowiedzi na poniższe pytania dotyczące pracy:

1. Z pracy nie wynika, który typ markerów DArTseq był wykorzystywany, silicoDArT czy DArTseq typu SNP? W metodyce podano sposób analizy 0/1, co wskazywałoby na markery silicoDArT. Z kolei ilość uzyskanych markerów pozwala przypuszczać, że wykorzystano oba typy markerów, wymagałoby to jednak potraktowania DArTseq typu SNP jako markerów dominujących. Czy mogłabym prosić o wyjaśnienie tej kwestii?
2. Czy metoda sekwencjonowania Oxford Nanopore jest jedyną technologią sekwencjonowania w czasie rzeczywistym i jak przebiega sekwencjonowanie w tej metodzie? Dlaczego ta technologia została wybrana do sekwencjonowania pojedynczych klonów?
3. Jakie jest pochodzenie gatunku *Secale cereale* i co oznacza, że jest to wtórny gatunek uprawny? Czy możliwe jest wskazanie genów, które brały udział w procesie udomowienia żyta, a więc w powstaniu formy uprawnej na bazie gatunku dzikiego?
4. Proszę o skomentowanie stwierdzeń zawartych w pracy: (1) Wykazano zatem występowanie zróżnicowania sekwencyjnego pomiędzy liniami wsobnymi żyta (tj. L318 i Lo7) – różnice w porównywanych sekwencjach obu genomów wynoszą maksymalnie 4%. (2) Na podstawie porównania sekwencji genów z klonów BAC z genomem żyta Lo7 zaobserwowano dosyć znaczne różnice między genomami tych linii wsobnych. Mimo, że uzyskano dopasowania dla 83% przypuszczalnych genów, były to ich krótkie fragmenty. Dla ponad 60% z nich długość pokrywających się sekwencji nie sięgała 75% ich całej długości.

Podsumowując, rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Borzęckiej oceniam bardzo pozytywnie. Stanowi ona oryginalne, kompleksowe rozwiązanie problemu naukowego poszerzające aktualny stan wiedzy. Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę Kandydatki w dyscyplinie nauki biologiczne oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Borzęckiej pt. „Wykorzystanie biblioteki BAC do integracji map fizycznych i genetycznych oraz identyfikacji genów związanych z udomowieniem i odpornością na choroby żyta” spełnia wszystkie wymogi formalne przedstawione w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668, z późn. zm.). Wniosuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Ewy Borzęckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Edyta Penuś-Gusła

