

Poznań, 07.06.2022

Andrzej Pacak  
Zakład Ekspresji Genów  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

### 1. Informacje o recenzowanej pracy doktorskiej.

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr Mateusza Przyborowskiego zatytułowanej „Identyfikacja czynników genetycznych warunkujących twardość ziarna w materiałach hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”. Praca została wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej, w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Anny Nadolskiej-Orczyk oraz promotora pomocniczego Pana dr inż. Sebastiana Gasparisa.

Praca doktorska składa się z dwóch części: właściwej pracy doktorskiej, liczącej 149 stron oraz z materiałów dodatkowych, które zostały umieszczone w opracowaniu liczącym 100 stron i zawierającym 31 tabel. Właściwa praca doktorska została podzielona na 7 części kolejno: Wprowadzenie, Przegląd literatury, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i wnioski, Spis literatury. Dodatkowo w pracy zostały zamieszczone: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, 15 tabel i 34 rysunki.

Obiektem badań jest pszenica, badaną cechą jest twardość ziarniaka w powiązaniu do zmian allelicznych genów *Pin*. Badania wykonano na 16 odmianach/liniach pszenicy. Literatura zawiera 238 publikacji.

Prezentowane badania były finansowane w ramach dwóch projektów, zaś ich wyniki zostały w części opublikowane w czasopiśmie *Agronomy* (2020) i zgłoszone we wniosku patentowym.

**Celem pracy była kompleksowa analiza czynników warunkujących twardość ziarna pszenicy w odmianach i liniach hodowlanych wykorzystywanych w polskiej hodowli.**

Już na wstępie mojej recenzji chciałbym zaznaczyć, że doktorant wywiązał się z postawionego przez siebie/promotorów zadania. Zatem moja recenzja jest pozytywna.

Uważam, że badania mają bardzo ważny aspekt nie tylko naukowy ale też gospodarczy i bardzo się cieszę, że są prowadzone badania wyjaśniające powiązania pomiędzy

istotnymi cechami, ważnych gospodarczo zbóż, a podłożem molekularnym. I tu już na wstępie mam do doktoranta pytanie:

**Pytanie 1.1.** Jak twardość ziarna pszenicy wpływa na długość czasu przechowywania/magazynowania ziarna. Przy założeniu, że po tym okresie przechowywania ziarno wciąż jest zdolne do kiełkowania.

Uwagi:

1.2. Generalna uwaga - Mam wątpliwości na ile można w pracy doktorskiej umieszczać zdjęcia pochodzące z publikacji bez zgody autora lub wydawnictwa, gdzie pierwotnie dane zdjęcie się ukazało, patrz Rysunek 5. Uważam że autor zamiast rysunków innych autorów powinien zamieścić rysunki/zdjęcia związane bezpośrednio z pracą np. zdjęcie urządzenia do pomiaru twardości ziarna, same ziarniaki, pszenicę, która rosła w warunkach polowych i fitotronowych tak aby praca odzwierciedlała pracę wykonaną przez doktoranta.

1.3. W samej pracy zabrakło mi stwierdzeń typu zrobiłem, wykonałem, co pokazałoby mi jako recenzentowi, które eksperymenty, obliczenia, analizy statystyczne zostały wykonane bezpośrednio przez doktoranta.

## 2. Najważniejsze osiągnięcia doktoranta.

Celem pracy doktorskiej było znalezienie korelacji pomiędzy obecnością określonych alleli genów *Pin*, ich ekspresją, a twardością ziarna badanych odmian i linii pszenicy. Co też bardzo istotne doktorant zaproponował narzędzia diagnostyczne, które umożliwiałyby szybką i wiarygodną identyfikację alleli genów *Pin*, których obecność jest skorelowana z twardością ziarna.

2.1. Za najważniejszą część pracy uważam punkt **4.4.3 Korelacje**, i to ten punkt definiuje całą pracę doktorską. Analizy w nim zawarte pokazują, co warte podkreślenia obiektywne relacje, i tu odwrócić kolejność jaka występuje w pracy doktorskiej, pomiędzy ekspresją genów a twardością ziarna. Co z tej analizy wynika:

2.2. Jedynym istotnie statystycznie rezultatem jest relacja pomiędzy ekspresją (znormalizowaną) genu *Pina* w 20 DAP z twardością (analizy bez podziału).

2.3. Istotnie statystycznie rezultaty z uwzględnieniem podziału na grupy względem genu *Pina*: *Pina* 14 DAP/*Pinb-D1d* = -0,84; *Pina* 20 DAP/*Pinb-D1d* = -0,95; *Pina* 26 DAP/*Pinb-D1c* = 0,56; *Pinb*: *Pinb* 14 DAP/*Pinb-D1d* = -0,84, *Pinb* 20 DAP/*Pinb-D1b* = 0,65, *Pinb* 20 DAP/*Pinb-D1d* = -0,84, *Pinb* 26 DAP/*Pinb-D1a* = 0,44, *Pinb* 26 DAP/*Pinb-D1b* = -0,73, *Pinb* 26 DAP/*Pinb-D1c* = 0,52.

2.4. Istnieją pozytywne istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genów *Pina* i *Pinb* a ekspresją genów *SPA-A*, *SPA-B*, *SPA-D* oraz innymi wytypowanymi bioinformatycznie czynnikami transkrypcyjnymi.

W tym przypadku sugerowałbym aby dla tych czynników transkrypcyjnych, które wykazały w analizie najwyższą pozytywną wartość korelacji np. dla Traes\_1AL\_A9FB6BF52 zweryfikować możliwość fizycznego przyłączenia się białka Traes\_1AL\_A9FB6BF52 do promotora genu *Pina* metodami eksperymentalnymi: drożdżowy system jednohybrydowy, EMSA, zmiana w promotorze genu *Pina* blokująca przyłączenie się czynnika transkrypcyjnego Traes\_1AL\_A9FB6BF52.

2.5. Poznanie zmienności allelicznej genów *Pina* i *Pinb* w badanych liniach i odmianach pszenicy.

2.6. Nie zaobserwowano wpływu zmienności allelicznej w obrębie genu *Pina*, występował wyłącznie allel typu dzikiego *Pina-D1a*. W przypadku genu *Pinb* największy udział stwierdzono dla allelu *Pinb-D1b* (57%).

2.7. Przeanalizowano wpływ zmienności allelicznej genu *Pinb* na twardość ziarna.

**Wynik.** Doktorant zwrócił uwagę na występowanie odmiany oznaczonej numerem 2627 z allelem *Pinb-D1b*, której twardość ziarna wynosiła 17,43, co jest najniższą wartością notowaną dla odmian niosących allel *Pinb-D1b*.

2.8. Znalezienie narzędzia do szybkiej identyfikacji alleli genów *Pin*.

**Wynik.** Rekomendowaną techniką do identyfikacji alleli genów *Pin* jest allelospecyficzny, multipleksowy PCR.

Komentarz 2.9. W pierwszej chwili zabrakło mi jasno postawionych celów pracy, bardzo przeszkadzał mi ich brak do poprawnej oceny przedstawionych rezultatów, gdyż nie do końca rozumiałem dlaczego pewne analizy zostały wykonywane. (Uwaga - cele pracy zostały wprawdzie podane na stronie 18 ale w bardzo lakoniczny sposób). Natomiast w dyskusji bardzo mi odpowiadało zestawienie celów pracy z jej wynikami. Na przyszłość jednak sugerowałbym umieszczenie bardziej szczegółowych opisów celów pracy na jej wczesnym etapie.

2.10. Identyfikacja innych czynników niż geny *Pin* wpływających na twardość ziarna.

**Wynik.** Wykazano istotne różnice w twardości ziarna dla odmian pszenicy Viscount i Finezja uprawianych w warunkach polowych i fitotronowych. Pokazuje to jak istotne są warunki środowiskowe, które wpływają na twardość ziarna. Natomiast to jakie są to czynniki i jak działają może być tematem dalszych badań.

2.11. Identyfikacja różnic w sekwencjach promotorowych genów *Pin* pochodzących z różnych odmian/linii pszenicy.

**Wynik.** Nie stwierdzono różnic.

2.12. Analiza ekspresji genów kodujących znane i wytypowane bioinformatycznie (14 czynników) czynniki transkrypcyjne, które są powiązane z twardością ziarna/promotorami genów *Pin*.

**Wynik.** Istnieje pozytywna korelacja pomiędzy ekspresją genów *Pin* oraz genami *SPA*.

### 3. Moje uwagi do wykonanych analiz zaprezentowanych w przedłożonej pracy doktorskiej.

3.1. Na pochwałę zasługuje strona eksperymentalna pracy m.in. sposób przygotowania DNA, RNA, identyfikacji zanieczyszczeń DNA w próbach RNA. Nie mam do tej części żadnych zastrzeżeń jak i do wykonanych analiz statystycznych.

3.2. Bardzo mi się podoba sposób pozyskania endonukleazy CEL1 z selera, co może być przykładem dla innych badaczy jak można pozyskiwać narzędzia eksperymentalne. Szkoda tylko, że o tym dlaczego taka procedura pozyskania endonukleazy została zastosowana dowiedziałem się w części dyskusja. Taka informacja powinna być podana wcześniej.

3.3. Na szczególne uznanie zasługuje sposób pomiaru zawartości białka, skrobi oraz glutenu w ziarniakach wykonane własnoręcznie przez doktoranta m.in. metoda Kjeldahla.

3.4. Zabrakło mi ogólnego rysunku, który obrazowałby wykonanie określonych kroków eksperymentalnych, ich celowość. Tłumaczyłby dlaczego wykorzystano enzym Cel1, dlaczego wybrano określone fragmenty DNA do amplifikacji. Chcę w tym przypadku podkreślić, że duża część tych informacji została zawarta w części Dyskusja, jednak moim zdaniem powinna ona być opisana wcześniej dając czytelnikowi możliwość zrozumienia dlaczego wykonano takie a nie inne analizy.

3.5. Zabrakło mi jasnego uszeregowania, przedstawienia informacji dotyczącej badanego materiału: jakie odmiany są badane, dlaczego i kolejności przeprowadzonych badań. O tym jakie badano odmiany pszenicy można było się dowiedzieć z materiałów dodatkowych, Tabele S1 i S2. A przecież to pszenica, jej odmiany, ziarno pochodzące z danych odmian były materiałem badawczym. Zabrakło mi informacji, która z zastosowanych technik eksperymentalnych służących do identyfikacji obecności danego allelu genu *Pina* lub *Pinb* jest techniką referencyjną, rozumiem, że było to sekwencjonowanie, a następnie stosowano kolejne techniki badawcze.

3.6. Oprócz tych ogólnych pytań mam też uwagi i pytania bardziej szczegółowe.

3.6.1. Strona 19 – alloheksaploidalnych, powinno być alloheksaploidalnych.

3.6.2. Strona 20 - Co oznacza skrót star. Na rysunku 1.

3.6.3. Strona 21 - Białek gluteninowych, czy chodzi o białka glutenowe?

3.6.4. Strona 21 – homoeologów, dlaczego został użyty ten termin a nie homolog, poprosiłbym o wyjaśnienie.

3.6.5. Strona 21 – tranzycja guanidyny na adeninę – guaniny na adeninę.

**3.6.6. Pytanie**, Strona 23 - Czym jest friabilina? Czy jest to mieszanina białek PINA i PINB, nie rozumiem stwierdzenia, że białka PINA i PINB stanowią frakcję białka friabiliny.

3.6.7. Strona 24 - Rysunek 3 – nieczytelne są opisy na rysunku.

**3.6.8. Pytanie**, Strona 38 - W jakim celu do izolowanego RNA dodawano 1-bromo-3-chloropropan?

3.6.9. Strona 41 - Co to za bufor NH<sub>4</sub>? Czy ma on coś wspólnego z jonem amonowym?

3.6.10. Strona 68 - Rysunek 12, brak oznaczenia jaki marker długości został zastosowany oraz brak jest pokazania jakie są długości prążków referencyjnych co uniemożliwia poprawną analizę fragmentów restrykcyjnych, to samo tyczy się rysunku nr 14 na stronie 70.

3.6.11. Strona 79 - Rysunek 24, Na tym rysunku widzę prążki oznaczające białka puroindolinowe dla allelu *Pinb-D1a*, ale dla pozostałych alleli nie mogę stwierdzić co się znajduje na wysokości 15 kDa, brak jest też kontroli nałożenia.

3.6.12. Strona 79 słowo ktróra – powinno być która.

3.6.13. Rysunek 30 strona 92, Czy na rycinie A. została przedstawiona analiza allelu genu *Pina* czy też allelu genu *Pinb*?

3.6.14. Strona 93 słowo homoeologów – homologów, patrz punkt 3.6.4.

Dodatkowe pytania odnośnie pracy doktorskiej.

**3.6.15. Pytanie**, Dlaczego w procedurze cięcia endonukleazą CEL1 użyto innych fragmentów DNA niż w analizie HRM-PCR a jeszcze inne fragment DNA wykorzystano w analizie CAPS?

**3.6.16. Pytanie**, Czy procedura przedstawiona na stronie 50 dotycząca ekstrakcji białek puroindolinowych była specyficzna tylko dla tych białek i inne białka nie były ekstrahowane podczas izolacji przy zastosowaniu tej procedury?


**3.6.17. Pytanie**, Jak ma się obecność danego allelu tj. *Pinb-D1a*, *Pinb-D1b*, *Pinb-D1c*, *Pinb-D1d*, *Pinb-D1g* na twardość ziarna? W pracy doktorskiej podana jest wartość liczbowa twardości ziarna w relacji do obecności danego allelu. W tym punkcie chciałbym oprócz tej wartości liczbowej dowiedzieć się więcej jak dana twardość wpływa na kiełkowanie ziarna, czas jego przechowywania i czy rzeczywiście dane odmiany lub linie zawierające określony allel charakteryzują się odpowiednimi cechami wynikającymi z twardości ziarna?

**3.6.18. Pytanie,** Na jakiej odmianie pszenicy została wykonana analiza RNA-seq, stadia 14 i 20 DAP.

**3.6.19.** Proszę o przygotowanie tabeli zbiorczej gdzie dla danej, badanej w pracy odmiany będzie podana nazwa badanej odmiany lub linii, twardość ziarna i kolejno wyniki, tj. obecność danego allelu, poziom ekspresji genów *SPA* i innych czynników wytypowanych bioinformatycznie, zawartość białek i proszę o informację, które odmiany są uprawiane w Polsce w celach gospodarczych, oraz jaka jest cecha wyróżniająca daną odmianę/linię, w taki sposób aby można było te odmiany/linie z sobą porównać.

#### 4. Podsumowanie recenzji.

Podsumowując moją recenzję stwierdzam, że przedstawiona praca doktorska Pana mgr Mateusza Przyborowskiego zatytułowana „Identyfikacja czynników genetycznych warunkujących twardość ziarna w materiałach hodowlanych pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)” spełnia wymagania stawiane rozprawie doktorskiej określone w art. 187 USTAWY ustęp 1, 2, 3, 4 z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.), oraz zawarte w art. 13 USTAWY z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Zwracam się do Rady Naukowej IHAR-PIB w Radzikowie o dopuszczenie Pana mgr Mateusza Przyborowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie agronomia.

  
Andrzej Pacak