

**Recenzja pracy doktorskiej pana mgr Wojciecha Wesołowskiego
pt. „Analiza molekularnych podstaw cytoplazmatycznej męskiej sterylności u buraka
zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.)”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marka Szklarczyka**

1. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Wesołowskiego pt. „Analiza molekularnych podstaw cytoplazmatycznej męskiej sterylności u buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.)” została wykonana w Zakładzie Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Promotorem pracy był dr hab. Marek Szklarczyk.

Tematyka rozprawy dotyczy niezmiernie istotnego zjawiska jakim jest cytoplazmatyczna męska sterylność u buraka zwyczajnego a w szczególności: identyfikacja markerów molekularnych służących identyfikacji alleli restorerowych, charakterystyka profilu transkryptomicznego i proteomicznego w powiązaniu z obecnością alleli restorerowych. Wpisuje się ona doskonale w nurt badań prowadzonych w Zakładzie Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie będąc jednocześnie częścią dwóch projektów badawczych: PBZ-MNiSW-2/3/2006/35 i Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi - HOR hn-4040 dec-2/08 nr 1. Tytuł ocenianej rozprawy w pełni odzwierciedla zakres wykonanych prac.

2. Dane formalne o rozprawie

Układ rozprawy jest typowy dla opracowań z tego zakresu. Składa się nań 10 rozdziałów (razem z aneksem i streszczeniem w języku polskim) oraz 92 numerowane strony tekstu. W tekście zamieszczono 31 tabel, 25 z nich znajduje się w tekście głównym a 6 zostało umieszczonych w aneksie. W tekście umieszczono również 37 rycin.

Praca poprzedzona jest wykazem stosowanych skrótów oraz ich rozwinięciem w języku polskim i angielskim.

Pierwszym rozdziałem jest **Wstęp** przedstawiający w sposób syntetyczny na 2 stronach (1-2) informacje dotyczące podstaw CMS, metod reprodukcji cytoplazmatycznie męskosterylnego komponenta matecznego, istoty mapowania genetycznego jądrowych loci restorerów oraz znaczenia analiz transkryptomicznych i proteomicznych wpływających na badany mechanizm.

Następnym rozdziałem jest **Cel pracy** po którym przedstawiony został **Przegląd literatury** (4-18), a następnie rozdział **Materiały i metody** (str. 19-30). Rozdział **Wyniki** obejmuje 50 stron (31-81) a za nim umieszczono na 9 stronach (82-90) rozdział **Dyskusja**. **Wnioski** przedstawiono na stronie 91 i 92.

Kolejnym rozdziałem jest **Spis literatury** zawierający 103 pozycje bibliograficzne (z tego 10% po 2015 roku) a po nim następuje **Aneks** zawarty na 12 stronach (101-113).

Praca zakończona jest dwustronnym streszczeniem w języku polskim opisującym w wystarczającym stopniu zakres wykonanych prac.

Proporcje ilościowe pomiędzy przeglądem literatury, a częścią eksperymentalną (materiał, metody i wyniki) oraz dyskusją są dobrze wyważone.

3. Ocena rozprawy

Cel Pracy został przedstawiony w sposób jednoznacznie prawidłowy a dodatkowe wykazanie poszczególnych, trzech etapów jego realizacji pozwala na późniejszą łatwość w śledzeniu postępów prac eksperymentalnych.

Kolejny rozdział to **Przegląd literatury** pokazujący w sposób przejrzysty sytuację w badaniach na przestrzeni ostatnich lat, dając dobre podstawy dla dalszej analizy tematu oraz pozwala na zrozumienie celowości podjęcia badań jak i ich znaczenia w programach hodowlanych nie tylko buraka ale również u innych roślin wyższych.

Chronologia poszczególnych podrozdziałów pozwala na konsekwentne prześledzenie kolejnych etapów wykonanych prac badawczych. Na początku, w sposób szczegółowy opisana jest hodowla buraka cukrowego w oparciu o zjawisko heterozji. Następnie, przedstawione jest podłoże genetyczne cytoplazmatycznej męskiej sterility oraz metodyka otrzymywania męskosterylnych linii matecznych. W celu zrozumienia istoty CMS przedstawiono sposób reprodukcji linii matecznych i dopełniających gdyż jest to jeden z najistotniejszych elementów hodowli heterozyjnej buraka. Ze względu na mitochondrialną deteminantę tej cechy oraz na charakter genomu mitochondrialnego (wysoka aktywność

rekombinacyjna) w dalszej części przeglądu literatury przedstawiono genetyczne i molekularne jej podstawy u wybranych gatunków: kukurydzy, petunii, fasoli i słonecznika. Po wyjaśnieniu mechanizmu działania genów chimerycznych opisane zostały mechanizmy działania genów restorerowych.

W ostatnich rozdziałach scharakteryzowano szereg technik molekularnych wykorzystywanych przy poszukiwaniu markerów sprzężonych z allelami restorerowymi a także przedstawiono dotychczasowe osiągnięcia w tej materii.

Niestety, przedstawiona w tym rozdziale problematyka udokumentowana jest w sposób niezadowalający dokumentacją bibliograficzną (szczegóły poniżej).

Rozdział **Materiały i Metody** jest obszerny, niemniej wydaje się to być uzasadnione liczbą zastosowanych technik wynikających z konieczności uzyskania zakładanego efektu badań. Zastosowanie warsztatu takiego jak przykładowo: izolacja kwasów nukleinowych (DNA, RNA), amplifikacja metodą RAPD, genotypowanie technologią DART, analiza strukturalna i funkcjonalna po sekwencjonowaniu technologią RNAseq, hybrydyzacja typu Northern, izolacja mitochondriów w celu wykonania analiz kompleksów białkowych i pojedynczych białek z zastosowaniem rozdzielców elektroforetycznych typu PAGE i SDS-PAGE i w końcu analiza wyników spektrometrii masowej wskazuje na opanowanie dużej liczby technik analitycznych i wykonanie ogromu prac laboratoryjnych, co w konsekwencji zaowocowało uzyskaniem interesujących wyników.

Rozdział **Wyniki** został przedstawiony w sposób syntetyczny, dzięki czemu jest on przejrzysty ułatwiając tym samym jego czytanie i analizę. Składają się na niego głównie: zdjęcia żeli agarozowych, poliakrylamidowych, analiz typu Northern blot, analizy różnicowe transkryptomów roślin o fenotypie sterylnym/płodnym w postaci tabel i wykresów wygenerowanych dla zastosowanych pakietów analizujących (w tym dla określenia poziomu transkrypcji genów mitochondrialnych i plastydowych), analizy mitochondrialnych kompleksów białkowych pod kątem ich rozmiaru oraz aktywności kompleksów wchodzących w skład łańcucha oddechowego, analizy profili białkowych badanych form (sterylna/męskopłodna dopełniająca/przywrócona płodność) z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej. Jednym z najważniejszych wyników było przedstawienie grup sprzężeń (po 9) dla dwóch analizowanych populacji: S04 786 i S04 1061, mapy fizycznej chromosomu czwartego dla genów kodujących białka PPR jak i mapy genetycznej na bazie markerów molekularnych populacji S04 786.

W sposób oczywisty dokumentują one poszczególne etapy prac eksperymentalnych wykonywanych przez doktoranta. Możemy prześledzić cały proces kreacji od dobrze przemyślanego wyboru bardzo obszernego materiału biologicznego dostosowanego do takich analiz poprzez dobór odpowiednich, różnorodnych technik analitycznych kończąc na próbie określenia (*in silico*) na podstawie wyników spektrometrii mas LC-MS/MS białek różnicujących dwa typy cytoplazmy, spełniając tym samym główny cel pracy .

Rozdział **Dyskusja** został skonstruowany w postaci rozbudowanych akapitów w których doktorant próbuje odnieść uzyskane wyniki do literatury tematu. W mojej ocenie na uwagę zasługuje fragment dotyczący wpływu warunków środowiskowych na "ekspresję fenotypową CMA". Ten temat został potraktowany bardzo ogólnikowo chociaż literatura wskazuje, że jest to istotny element mający wpływ na ekspresję genów tym bardziej, jeżeli mówimy o zmianie ekspresji fenotypowej. Czy zmiany te są dziedziczone, a jeżeli tak to w jaki sposób?

Kończącą częścią jest rozdział **Wnioski** składający się z dziesięciu bardzo rozbudowanych wniosków.

4. Uwagi

Rozprawa jest starannie napisana i przedstawiona, ale nie jest wolna od błędów. Na niektóre z nich chciałbym zwrócić uwagę.

Na pierwszym miejscu chcę zwrócić uwagę na spis literatury i co za tym idzie, na cytowania w tekście. W rozdziałach **Przegląd literatury** i **Dyskusja** (głównie) cytowanych jest 31 pozycji (z powtórzeniami jest ich 42!) które nie znajdują się w spisie literatury i odwrotnie, 4 pozycje obecne w spisie nie są cytowane w tekście. Dodatkowo, występują drobne błędy w datach cytowań. Pragnę wierzyć, iż jest to pomyłka zaistniała w trakcie składania pracy w całość (wklejona została pośrednia wersja) a nie zwykła niechlujność.

W podpisach rycin 7-9 i 10-12 powinna znaleźć się informacja, że są to grupy sprzężeń. Ze względu na fakt, iż podstawowa liczba chromosomów buraka $n=9$, może to być mylone, jako że dla obydwu populacji skonstruowano po 9 grup sprzężeń.

W rozdziale **Materiały i metody** pojawia się termin RAPD-PCR (podrozdział 4.5) i skrót ten konsekwentnie używany jest np. w podpisach pod rycinami 4, 5, 6. Jako że technika RAPD jest odmianą reakcji PCR, dodawanie tej nazwy po myślniku jest niepoprawne. W tym samym rozdziale (a także w dalszym tekście) występuje fraza "obiekty buraka cukrowego" jako opis materiału biologicznego reprezentującego linie lub populacje użyte w badaniach (np. str 19,

Tab. 2). W rozdziale **Dyskusja** pojawia się sformułowanie "ilość transkryptów" zamiast "liczba transkryptów" - wydaje się to błędem.

W podrozdziale 5.9.2 zaznaczono, że analizy wykonano w pojedynczym eksperymencie. Czy w tak istotnej analizie jak porównanie profili białek mitochondrialnych 3 linii nie powinno się wykonać przynajmniej potwierdzenia wyników w szczególności, choć nie tylko, kiedy mówimy o prążku CMA-K?

W zakończeniu **Dyskusji** stwierdzono, że "na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano model ..." - zobrazowanie otrzymanych wyników schematem z całą pewnością w znacznym stopniu wzbogaciłoby pracę, wskazując jednocześnie na analityczne podejście doktoranta do wyników. Pozwoliłoby, dodatkowo, na łatwiejszy ogląd tematu.

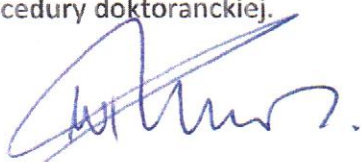
W moim odczuciu rozdział **Wnioski** wymaga dużego przeredagowania. Praktycznie w każdym z nich (może z wyjątkiem wniosku 9) w pierwszej jego części przedstawione są wyniki.

Końcowe zdanie prawie każdego z nich można przeredagować na prawomocny wniosek (poza siódmym, który w całości jest opisem wyniku).

5. Podsumowanie

Recenzowana rozprawa jest bez wątpienia bardzo wartościowym opracowaniem nie tylko na poziomie podstawowym ale być może w niedalekiej przyszłości również na poziomie aplikacyjnym. Na jej podstawie można określić, że doktorant w sposób zadowalający posługuje się wieloma, często skomplikowanymi, technikami badawczymi, potrafi zaplanować kolejność wykonywanych eksperymentów a także wyciągać wnioski w trakcie swoich prac w celu modyfikacji stosowanych procedur mających na celu uzyskanie jak najlepszych wyników.

Oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje dużą wiedzę teoretyczną Pana mgr Wojciecha Wesołowskiego w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie biotechnologia oraz jego umiejętność prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje zatem do Rady Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie o dopuszczenie Pana mgr Wojciecha Wesołowskiego do dalszych etapów procedury doktoranckiej.



prof. dr hab. Wojciech Pląder