

Wpłynęło dnia 2019-03-29
5DB:O 520-15.7/2019

Szczecin 25.marca 2019 r

prof. dr hab. Piotr Masojć
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Wesołowskiego pt. "Analiza molekularnych podstaw cytoplazmatycznej męskiej sterylności u buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.)" wykonanej w Zakładzie Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Mgr inż. Wojciech Wesołowski w swojej rozprawie doktorskiej podjął próbę wyjaśnienia podstaw genetyczno-molekularnych zjawiska męskiej sterylności u buraka cukrowego. Tematyka ta ma duże znaczenie zarówno naukowe jak i utylitarne, gdyż współczesna hodowla buraka jest nakierowana na tworzenie odmian mieszańcowych dających wysoki plon i dużą zawartość cukru dzięki wykorzystaniu zjawiska heterozji.

Rozprawa doktorska została zrealizowana pod opieką naukową dr hab. Marka Szklarczyka i była częściowo finansowana grantami z MNISW i MRiRW. Praca jest w formie zwartej monografii liczącej 114 stron, na którą składają się rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Przegląd literatury, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura, Aneks i Streszczenie. W pracy znalazły się: wykaz stosowanych skrótów, 24 tabele, 37 rycin i 103 pozycje literatury światowej. W tytule pracy powinno być raczej określenie burak cukrowy, gdyż ogólna nazwa gatunkowa nie jest w odniesieniu do obiektu badań precyzyjna. Konstrukcja pracy jest właściwa rozprawom doktorskim zawiera wszystkie niezbędne elementy pozwalające na wszechstronną jej ocenę. Tekst pracy jest napisany w sposób jasny, dobry językowo, w uporządkowany sposób prowadzi czytelnika przez poruszane zagadnienia, mimo że natura tych badań jest wielopłaszczyznowa i złożona. Wstęp dobrze wprowadza w problem badawczy, jasno podane są także cele pracy. Przegląd literatury liczy 14 stron na których w oparciu o liczne dane źródłowe naświetlono dotychczasowy stan wiedzy na wielu płaszczyznach analizowanego problemu. Zadziwia fakt, że wśród prac źródłowych z ostatnich lat nad genetycznym uwarunkowaniem CMS u buraka cukrowego brakuje prac polskich badaczy. Świadczy to o dość pionierskim w skali kraju przedsięwzięciu jakim jest niniejsza praca. Ubolewać należy nad faktem, że jeden z czołowych dla krajowej produkcji roślinnej gatunków nie jest szerzej eksplorowany przez krajową genetykę i biotechnologię. Rozdział Materiał i Metody zawiera co prawda opisy wszystkich ważniejszych metod stosowanych w pracy, jednak brakuje w nim szeregu informacji doprecyzowujących sposoby liczenia parametrów, zasad konstrukcji map genetycznych, definicji pojęć, czy charakterystyki zastosowanych w badaniach materiałów genetycznych (szczegółowe uwagi w dalszej części recenzji). Wyniki

przedstawiono w sposób wyczerpujący, dobrze zilustrowany tabelami i rycinami, co pozwala na ich dogłębną analizę. Dyskusja jest wnikliwa, świadczy o dojrzałym spojrzeniu na wyniki własne na tle literatury. Właściwie wyprowadzone są hipotezy które można sformułować w oparciu o uzyskane rezultaty. Wnioski są trafne, dobrze sformułowane, dobrze charakteryzują najważniejsze osiągnięcia pracy.

Praca jest nakierowana na opracowanie markerów molekularnych, które dzięki sprzężeniu z genem restorerem mogłyby posłużyć do selekcji trudnych do bezpośredniej identyfikacji fenotypowej komponentów ojcowskich dla odmian mieszańcowych oraz na ustalenie jakie geny i białka różnicują formy męskosterylne i męskopłodne pod względem poziomu ekspresji. Badania które autor przedsięwziął dla realizacji celów pracy są bardzo rozległe, wnikliwe i wielopłaszczyznowe, co świadczy o opanowaniu przez doktoranta nowoczesnego warsztatu badawczego w zakresie genetyki molekularnej, genomiki i proteomiki. Są one także świadectwem prawdziwej pasji badawczej, która przejawia się dążeniem do dogłębnego wyjaśnienia badanych zagadnień. Pierwsze z najważniejszych zamierzeń tj. opracowanie markerów molekularnych dla genów restorerów Rf1 i Rf2 zostało wykonane z sukcesem dzięki zastosowaniu różnych technik markerowych w tym RAPD, DArT, SSR oraz SCAR i CAPS. Wstępnie związek markerów z cechą badano określając asocjację markerów z fenotypem męskosterylnym i fenotypem męskopłodnym. Dokładniejsze badanie wartości selekcyjnej markerów przeprowadzono poprzez konstrukcję molekularno-genetycznych map genomu buraka cukrowego. Sprzężenie markerów z genami Rf1 i Rf2 określono na mapach genetycznych dla dwóch populacji mapujących oraz przy wykorzystaniu trzeciej mapy dla chromosomu 4 zawierającego gen Rf2, którego obecność na tym chromosomie została w pracy potwierdzona. W silnym sprzężeniu z genem Rf2 zmapowano cztery markery, które będzie można wykorzystać w celach selekcyjnych w tzw. selekcji wspieranej markerami (MAS). Ponadto w niedużych odległościach znaleziono po 3 markery typu RAPD, CAPS i SSR oraz około 50 markerów DArT. Te osiągnięcia badawcze doktoranta mają duże znaczenie dla dalszej poprawy skuteczności prowadzonych prac hodowlanych nad odmianami mieszańcowymi buraka cukrowego.

Podjęta przez Doktoranta próba dotarcia do mechanizmu molekularnego cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności u buraka cukrowego budzi największy podziw, gdyż została zrealizowana w oparciu o rozległe badania z zakresu genomiki, transkryptomiki i proteomiki przy wykorzystaniu sekwencjonowania RNA-seq dla pięciu wybranych roślin męskosterylnych i pięciu roślin męskopłodnych z populacji mapującej. Uzyskano statystycznie potwierdzone różnice w poziomach ekspresji szeregu genów jądrowych i organellowych przypisanych do różnorodnych grup funkcjonalnych, a w szczególności do metabolizmu reaktywnych form tlenu (ROS), rozpadu ścian komórkowych oraz regulatorów ekspresji. Zidentyfikowano cztery geny z sekwencjami modułów typu PPR których podwyższona ekspresja była związana z obecnością restorera Rf2. Przeprowadzono

porównanie proteomów mitochondrialnych form męskosterylnych i męskopłodnych przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej i spektrometrii mas uzyskując wynik świadczący o nagromadzeniu białka preSATP6 w cytoplazmie sterylizującej S, które przypuszczalnie prowadzi do zaburzenia składania lub stabilności kompleksu V syntazy ATP. Stwierdzono także różnice w poziomie białka chaperonu HSP60 oraz białka manganozależnej dysmutazy ponadtlenkowej. Na podstawie tych rezultatów udało się autorowi stworzyć model mechanizmu molekularnego oddziaływań jądro-cytoplazma w generowaniu męskiej sterylności i przywracaniu płodności przez gen restorera u buraka cukrowego. Zgromadzony materiał badawczy w postaci szeregu form męskosterylnych, dopełniających restorujących oraz czterech populacji mapujących budzi mój szczerzy podziw dla rozmiaru prowadzonych eksperymentów. Jeśli dodamy do tego nowoczesne sekwencjonowanie RNA-seq transkryptomu i rozległe badania proteomiczne oraz finalizację tych wszystkich prac wysoce pozytywnymi wynikami spełniającymi założone cele pracy nasuwa się jedyny możliwy wniosek, że rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Wesołowskiego zasługuje na wyróżnienie. Z całą mocą podtrzymuję ten wniosek pomimo znalezionych przeze mnie pewnych niedociągnięć lub nieścisłości, które podaję poniżej i za ich powstanie obwiniam widoczny pośpiech w opracowywaniu tekstu rozprawy.

Uwagi:

1. Doktorant podał zbyt oszczędną charakterystykę genetyczną materiałów roślinnych użytych do ścisłych doświadczeń genetycznych. Np. nie podaje w metodyce czy populacja mapująca pochodzi ze skrzyżowania jednej rośliny matecznej z jedną rośliną ojcowską, nie podaje jakie pokolenie było badane F1, F2 czy dalsze, stosuje do opisu materiałów genetycznych pojęcie „obiekty”, które bardziej pasuje do doświadczalnictwa rolniczego a mniej do opisu jakim posługuje się genetyka, nie określa jaki był poziom ploidalności badanych materiałów genetycznych.
2. Pewne opisy, które powinny znaleźć się w metodyce znajdujemy w omawianiu wyników np. zasadę analizy segregacji jedynie w proporcji 1:1 przy konstrukcji mapy genetycznej, przecież program JoinMap potrafi scalać wyniki z różnymi stosunkami segregacji.
3. Brak w metodyce wyjaśnienia wzorem lub inaczej sposobów analizy wyników np. obliczanie współczynników kosegregacji markera z fenotypem, obliczanie poziomu pokrycia genów odczytami z RNA.
4. Błędne pojęcia np. kosegregacja 1:1 (str 45), powtarzany kilkakrotnie zwrot niegramatyczny – „występował /nie występował u prób” (str49).
5. W przeglądzie literatury na str. 9 chyba niezbyt udany opis produkcji nasion mieszańcowych buraka. Jaka w tym wszystkim rola restorerów?

6. W dyskusji znajdujemy jedynie opis słowny uzyskanego modelu mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw zjawiska CMS/płodności i interakcji cytoplazma --geny jądrowe. Przydałby się graficzny schemat.

Mam również kilka pytań do Autora:

1. Wyraźne jest rozciągnięcie mapy w pobliżu genów restorerów, które autor tłumaczy błędami w fenotypowaniu. Czy możliwe jest także, że fenotyp męskopłodny mógł być modyfikowany przez interakcje Rf1 z Rf2 lub z innymi pomniejszymi genami wpływającymi na męską płodność?
2. Dlaczego mitochondria pochodziły z korzeni a nie z pręcikowia? Rozumowanie o wpływie sytuacji zastanej w komórkach korzeniowych na cechę związaną z kwiatami musi być więc czymś uzasadnione. Proszę o to uzasadnienie.
3. Jak wytłumaczyć pojawienie się trzeciego allela w markerach SSR z populacji mapujących?
4. Jak można wytłumaczyć fakt, że marker mCP-L6 w populacji S04 1061 wykazuje kosegregację z cechą MS a w populacji S 04 786 nie (Tab. 8)?

Podsumowanie

Mgr inż. Wojciech Wesołowski opracował bardzo wartościową pod względem naukowym i użytkowym rozprawę doktorską w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie biotechnologia, wychodzącą naprzeciw oczekiwaniom krajowej hodowli buraka cukrowego. Opracowane w niej markery molekularne genów restorerów jako nowe narzędzia biotechnologii będą mogły wspomagać selekcję materiałów hodowlanych. Hipoteza wyjaśniająca mechanizm molekularny zjawiska męskiej sterylności/płodności u tego ważnego gospodarczo gatunku rośliny okopowej pozwoli na wejście badań na wyższy poziom, stwarzający szansę opracowania jeszcze lepszych, bardziej uniwersalnych narzędzi biotechnologicznych. Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem współczesnych metod badawczych biotechnologii w tym: metod genetyki molekularnej, mapowania molekularnego, genomiki, transkryptomiki i proteomiki na bazie analiz laboratoryjnych jak i analiz *in silico* na dużą skalę w oparciu o narzędzia bioinformatyki w postaci oprogramowania dla analizy sekwencyjnych baz danych. Z tych powodów wnoszę o dopuszczenie mgr inż. Wojciecha Wesołowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK KATEDRY

Prof. dr hab. Piotr Masojć