Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 10 lutego 2022r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Piotra Plewińskiego pt. „Genetyczne i molekularne podstawy cechy wczesności kwitnienia łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)"

Wprowadzenie

Łubin żółty jest gatunkiem uprawnym pochodzącym z rejonu basenu morza Śródziemnego o dużym i ciągle niewykorzystanym potencjale rolniczym i użytkowym. Należy do gatunków uprawnych o najniższych wymaganiach glebowych i wykazujących tolerancję na suszę. Trzeba podkreślić, że w ostatnich latach wraz z rozwojem rolnictwa zrównoważonego, niskonakładowego i ekologicznego wzrasta zainteresowanie łubinami i ujawnia się zapotrzebowanie na nowe wysokoplenne odmiany łubinów słodkich. Rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Piotra Plewińskiego dotyczy podłoża genetycznego ważnej cechy użytkowej łubinu żółtego, którą jest wczesność kwitnienia. Wykonane badania mają kompleksowy charakter i są w pełni uzasadnione, gdyż jak dotychczas nie prowadzono tak zaawansowanych prac genetyczno-molekularnych nad wczesnością kwitnienia u tego gatunku. Praca została wykonana w Zakładzie Struktury i Funkcji Genów pod opieką naukową Pana dr. hab. Michała Książkiewicza i Pani dr Sandry Rychel-Bielskiej. W Zakładzie tym od wielu lat prowadzone są prace nad genetyką i genomiką łubinów. Zrealizowanie pracy było możliwe dzięki dostępowi do warsztatu badawczego tego Zakładu i współpracy z innymi ośrodkami oraz polskimi firmami hodowlano-nasiennymi.

Dane formalne o rozprawie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorka liczy łącznie 212 stron i składa się z rozdziałów w układzie typowym dla prac eksperymentalnych, które stanowią: wstęp będący przeglądem literatury (54 strony), cel pracy (1 strona), hipotezy badawcze (1 strona), materiały i metody (33 strony), wyniki (34 strony), dyskusja (41 stron), wnioski (1 strona), streszczenie w języku polskim (2 strony) i streszczenie w języku ang7ielskim (2 strony) oraz spis literatury (11 stron). Rozprawę poprzedza spis treści oraz starannie przygotowany wykaz skrótów ułatwiający czytającemu dobre zrozumienie treści pracy. Układ pracy jest kompletny i przejrzysty, a wyniki badań są dobrze udokumentowane. W rozprawie zamieszczono 27 rycin i 36 tabel oraz dołączono aneks zawierający 7 tabel ze szczegółowymi danymi. Pewnym zaskoczeniem było dla mnie to, że streszczenia zostały umieszczone pomiędzy rozdziałami Wnioski i Spis literatury - zwykle są umieszczane na początku prac doktorskich. W treści pracy Autor odwołał się do 487 pozycji literatury źródłowej. To jest bardzo dużo, należy jednak zauważyć, że tematyka pracy wpisuje się w jeden z najważniejszych i najbardziej konkurencyjnych nurtów badawczych genetyki rozwoju, którym jest poznanie mechanizmów genetycznych kontrolujących kwitnienie roślin. Cytowane prace to przede wszystkim publikacje anglojęzyczne opublikowane w znaczących pismach naukowych, ale także

specjalistyczne opracowania w języku polskim i rosyjskim. W pracy zawarta jest informacja o tym, praca doktorska została wykonana w ramach badań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, realizowanych w latach 2014-2020 w ramach zadania pt. „Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne".

Ocena rozprawy

Część eksperymentalną pracy poprzedza obszerny i wielowątkowy wstęp, który wprowadza w tematykę pracy i dobrze uzasadnia podjęte badania. Autor szeroko przestawił ewolucję rodzaju *Lupinus* na tle roślin bobowatych i omówił potencjał użytkowy łubinów, w tym łubinu żółtego, wskazując na takie cechy jak: niskie wymagania glebowe i uprawowe, zdolność do symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego i korzystania z nierozpuszczalnych form fosforu, a także korzystny dla żywienia zwierząt i człowieka skład chemiczny nasion tego gatunku. Następnie Autor w systematyczny sposób przedstawił najważniejsze cechy użytkowe trzech gatunków uprawnych łubinu i geny, które je warunkują, zestawił markery molekularne opracowane dla tych genów oraz omówił światowe zasoby genowe łubinów. W ostatniej części wstępu Autor przedstawił zarys molekularnych podstaw regulacji kwitnienia, omawiając poszczególne szlaki poznane dla gatunków modelowych roślin. Po zapoznaniu się ze wstępem nasuwa się spostrzeżenie, że w obrębie łubinów uprawnych prace genetyczne i molekularne nad łubinem żółtym są nieliczne i ograniczone. To potwierdza, że podjęte przez Autora badania nad łubinem żółtym są w pełni uzasadnione. Należy przyznać, że zakres wiedzy zaprezentowany przez Autora we wstępie jest bardzo szeroki i nie mam żadnych wątpliwości, że Autor dobrze zna aktualną literaturę związaną z tematyką pracy. Nie jestem zwolennikiem zamieszczania rozbudowanych przeglądów literatury w pracach doktorskich, ale muszę przyznać, że wstęp jest ciekawy i dobrze się ten rozdział czyta.

W kolejnym rozdziale Autor zdefiniował cele pracy. Pierwszym celem było wskazanie genów kandydujących warunkujących wczesność kwitnienia łubinu żółtego, a drugim próba ich powiązania z terminem kwitnienia. W mojej ocenie cele pracy zostały dobrze zdefiniowane. W oparciu o obserwacje fenotypowe i dane literaturowe Autor postawił pięć hipotez badawczych. Postawione hipotezy mają charakter biologiczny, są zgodne z celami pracy i właściwie sformułowane.

W rozdziale czwartym Autor omówi omówił materiały roślinne i metody badawcze wykorzystane w pracy. W badaniach wykorzystano unikalny zestaw 111 akcesji łubinu żółtego. W zestawie tym było 107 odmian i linii o zróżnicowanym czasie kwitnienia i wrażliwości na wernalizację oraz różnym pochodzeniu, wytypowanych w oparciu o 15-letnie obserwacje kolekcji łubinu żółtego Poznańskiej Hodowli Roślin. Do tego zestawu dołączono linie rodzicielskie dwóch populacji mapujących łubinu żółtego (tzw. polskiej i australijskiej). W pracach laboratoryjnych Autor stosował standardowe metody i techniki biologii molekularnej wykorzystywane w mapowaniu genetycznym i analizie ekspresji genów, takie jak: izolacja kwasów nukleinowych, różne typy PCR, sekwencjonowanie, RT-qPCR i RNA-seq, genotypowanie markerów CAPS. Autor właściwe dobrał metody statystyczne i bioinformatyczne zarówno na potrzeby analizy danych fenotypowych, mapowania

genetycznego i identyfikacji QTL jak również analizy transkryptomów i RT-qPCR. Część zaawansowanych analiz statystycznych została wykonana we współpracy z doktorem Bartoszem Kozakiem (Katedra Genetyki i Hodowli Roślin oraz Nasiennictwa Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu), zaś analizy danych transkryptomicznych we współpracy z profesorem Pawłem Krajewskim (Zakład Biometrii i Bioinformatyki, IGR PAN w Poznaniu). Uważam, że materiały roślinne i metodyka badań została właściwie przedstawione. Jedyna uwaga dotycząca tej części pracy jest związana z nieprecyzyjnym przedstawieniem składu reakcji łańcuchowej polimerazy. W tabelach 7, 10 i 19 podano objętości poszczególnych składników, ale nie podano ich stężeń. Zapewne były to standardowe stężenia zalecane przez producenta polimerazy, jednak uważam, że powinny być podane.

Punktem wyjścia do badań Autorka była ocena terminu kwitnienia kolekcji łubinu żółtego w warunkach szklarniowych. Autor zaobserwował znaczące różnice w terminie kwitnienia i odpowiedzi badanych linii na wernalizację. Wyniki uzyskane podczas trzech lat doświadczeń były powtarzalne, co udowodniono statystycznie. To pozwoliło wiarygodnie określić odziedziczalność badanych cech w szerokim rozumieniu i uzyskać solidne dane oceny fenotypowej na potrzeby kolejnych etapów badań.

Wykorzystując dostępne dane sekwencyjne i literaturowe Autor zestawił panel sekwencji 78 homologów genów kontrolujących kwitnienie dla łubinu żółtego. Wśród tych genów były cztery homologi *FLOWERING LOCUS T (FT)*, czyli florigenu, zidentyfikowane w genomie łubinu żółtego *(FTLlut a1a, a1b, c1 i c2)*. Następnie Autor podjął próbę mapowania wybranych genów i wykonał analizy ich ekspresji. Na potrzeby mapowania genetycznego opracował markery CAPS dla 22 genów i wykorzystał populację mapującą Wodjil × P28213, udostępnioną przez dr. Matthew N. Nelsona (CSIRO, Australia). Na mapę udało się nanieść 9 genów związanych z kwitnieniem. Biorąc pod uwagę konserwatywny charakter tych uważam, że jest to dobry wynik, tym bardziej, że markery dla genów *LlutFTc1* i *LlutFTc2* zmapowały się w obrębie głównych loci odpowiedzialnych za termin kwitnienia i locus odpowiedzi na wernalizację. Dzięki wcześniejszym pracom zespołu nad łubinem wąskolistnym, Autor mógł wykonać analizę kolineraności genomów, która pozwoliła powiązać gen *LlutFTa1a* z trzecim QTL związanym z kwitnieniem.

W kolejnym etapie badań Autor wykonał analizę transkryptomiczną RNA-seq dla linii rodzicielskich dwóch populacji mapujących. Analiza danych RNA-seq została ukierunkowana na panel 78 genów związanych z kwitnieniem i w oparciu o uzyskane wyniki tej analizy oraz wcześniej wykonanego mapowania Autor wytypował pięć genów kandydujących odpowiedzialnych za wczesność kwitnienia. Wybór genów kandydujących jest przekonywująco uzasadniony dla trzech homologów *FT*, ale trochę mniej oczywisty dla homologów *FD* i *SOC1*. W dalszych pracach Autor dołączył do genów kandydujących czwarty homolog *FT*, dla którego nie wykazał związku z kwitnieniem, ale po to by mieć pełny obraz dla wszystkich homologów *FT* występujących w genomie łubinu żółtego.

Uzupełniając analizy RNA-seq Autor wykonał szczegółowe profilowanie ekspresji homologów *FT* metodą RT-qPCR, potwierdzając wpływ wernalizacji i fotoperiodu na ich transkrypcję. Następnie poprzez sekwencjonowanie ujawnił liczne polimorfizmy w tych genach. Najciekawsze okazały się rozległe insercje-delecje w promotorze genu *LLutFTc1*

(2227pz) i trzecim intronie *LLutFTc2* (5269 pz). Szczegółowa analiza ujawniła, że pierwszy polimorfizm koresponduje z polimorfizmem opisywanym dla łubinu wąskolistnego i innych gatunków roślin, a drugi jest następstwem insercji retrotranspozonu. Na bazie tych wyników Autor wykonał przesiewowe genotypowanie linii kolekcyjnych i wykonał analizę korelacji występowania tych polimorfizmów z terminem kwitnienia i odpowiedzią na wernalizację– takie korelacje wskazał dla rozległego polimorfizmu w rejonie promotorowym *LlutFTc1*, wszystkich polimorfizmów zidentyfikowanych dla *LlutFTc2* i niektórych polimorfizmów zidentyfikowanych dla *LlutFTa1a*. Wyniki te są trochę niespójne, ale może to wynikać z zastosowanej metodyki genotypowania opartej o PCR - dla niektórych markerów amlifikacja PCR mogła być niespecyficzna.

Zidentyfikowanie polimorfizmów w rejonach promotorowych skłoniło Autora do wykonania szczegółowej analizy *in silico* tych rejonów. Należy podkreślić, że promotory genów *FT* są rozbudowane i bogate w miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych oraz białek wpływających na strukturę chromatyny, a analizy bioinformatyczne promotorów wymagają krytycznej oceny wyników. Uważam, że Autor bardzo dobrze poradził sobie z tą analizą wskazując unikalne czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję badanych genów. Autor trafnie także zauważa, że potrzebne jest doświadczalne potwierdzenie wskazanych *in silico* interakcji czynników transkrypcyjnych z rejonami promotorowymi.

Dyskusja wyników jest bardzo szczegółowa, napisana w sposób usystematyzowany i ukierunkowana na analizę genów *FT*. Autor przedyskutował swe wyniki odnosząc się przede wszystkim do prac nad *Arabidopsis* i gatunkami z rodziny bobowatych, w tym nad łubinem wąskolistnym. W moim odczuciu w pewnych fragmentach dyskusji Autor za bardzo skupił się na omawianiu mechanizmów regulacji kwitnienia opisanych w literaturze, stosunkowo słabo eksponując wyniki własne. Uważam też, że wyniki oceny fenotypowej kolekcji mogły być szerzej przedyskutowanie. Za ciekawy, chociaż jednak trochę zbyt rozbudowany, uważam fragment dyskusji dotyczący wskazania potencjalnych czynników transkrypcyjnych oddziałujących z promotorami trzech genów *FT* łubinu żółtego.

Autor przedstawił osiem wniosków wynikających z przeprowadzonych badań. Wnioski te są zgodne z celami pracy i postawionymi hipotezami badawczymi. Jedyne spostrzeżenie, które mi się nasunęło podczas czytania wniosków dotyczy wniosku siódmego – myślę, że ten wniosek mógłby być sformułowany w sposób bardziej syntetyczny.

Podsumowując Autor w wieloletnim doświadczeniu ocenił kolekcję łubinu żółtego pod względem czasu potrzebnego do zakwitania i wpływu wernalizacji na tę cechę oraz określił odziedziczalność tych cech. Najważniejszym osiągnięciem Autora jest wskazanie trzech genów będących homologami *FT*, które jak się wydaje są odpowiedzialne za cechę wczesności kwitnienia i termoneutralność łubinu żółtego. Uzyskane przez Autora wyniki stanowią dobry punkt wyjścia do dalszych szczegółowych badań, a opracowane markery mogą znaleźć zastosowanie w hodowli twórczej. Pewnym utrudnieniem podczas czytania pracy są drobne niedociągnięcia edytorskie i stylistyczne, które nie umniejszają wartości merytorycznej przedstawionej rozprawy.

Pytania i uwagi do pracy

(1) Nie jest dla mnie do końca jasne w jaki sposób określano odpowiedź badanych linii łubinu na wernalizację. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób obliczano wartości liczbowe opisujące odpowiedź linii na wernalizację z uwzględnieniem poprawki na tak zwane „stopniodni".

(2) W badanym zestawie linii łubinu żółtego (tabela 6) znalazły się linie opisane jako „mutanty". Jakie mutacje posiadały te linie i w jaki sposób zostały uzyskane?

(3) U *Arabidopsis thaliana* w merystemie wierzchołkowym pędu białko FT konkuruje z represorem kwitnienia TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) o dostęp do czynnika transkrypcyjnego FD. W zależności od wyniku tej konkurencji następuje lub nie tranzycja merystemu wierzchołkowego pędu w merystem kwiatostanowy. Jestem ciekawy ile homologów *TFL1* występuje w genomie łubinu żółtego i czy są znane przesłanki wskazujące na powiązania tych genów z wczesnością kwitnienia.

(4) W pracy można doszukać się drobnych nieścisłości. Przykładowo w tabeli 7 gdzie zamieszczono informacje o pochodzeniu materiału badawczego dla niektórych linii podano kraj pochodzenia „ZSRR", powinno być „dawne ZSRR".

(5) W pracy dopatrzyłem się drobnych niedociągnięć edytorskich. Przykładowo:
- w tabeli 5 niektóre pola są puste i nie wyjaśniono dlaczego tak jest,
- w wierszu 11 na stronie 107 jest literówka w nazwie drugiego genu - powinno być *LlutFTc2*,
- w niektórych zdaniach brakuje przyimków lub spójników, a czasami spacji między wyrazami,
- cytując literaturę w tabelach Autor podaje w nawiasie zarówno nazwisko pierwszego autora jak i rok opublikowania pracy, zwykle w nawiasie jest tylko rok.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. inż. Piotra Plewczyńskiego dotyczy ważnej problematyki badawczej jaką jest zrozumienie genetycznych mechanizmów kwitnienia łubinu żółtego. Prace badawcze zostały dobrze zaplanowane, a uzyskane wyniki są oryginalne. Autor realizując pracę opanował szereg metod badawczych z zakresu fenotypowania roślin, genetyki molekularnej, statystyki i bioinformatyki oraz transkryptomiki. Pokazał, że potrafi definiować i rozwiązywać problemy badawcze oraz sposób krytyczny analizować i dyskutować uzyskane wyniki. Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe elementy stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i wobec tego wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu o dopuszczenie Autora rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, że względu na wysoką wartość naukową wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 10 lutego 2022r.

Uzasadnienie wyróżnienia pracy doktorskiej Pana mgr. inż. Piotra Plewińskiego

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr. inż. Piotra Plewińskiego jest na wysokim poziomie naukowym, ponieważ:

1. wyniki pracy poszerzają dotychczasową wiedzę na temat mechanizmach genetycznych kontrolujących kwitnienie roślin i wskazują kierunki prowadzenia dalszych prac badawczych,
2. Autor pracy po raz pierwszy pokazał, że trzy homologi genu *FT* występujące w genomie łubinu żółtego - *LlutFTc1*, *LlutFTc2* i *LlutFTa1a* są powiązane z wczesnością kwitnienia roślin tego gatunku w zależności od czynników środowiskowych takich jak wernalizacja i fotoperiod,
3. Autor pracy opracował szereg markerów molekularnych dla loci warunkujących wczesność kwitnienia łubinu żółtego - markery te mają potencjał aplikacyjny i mogą być przydatne w programach hodowlanych ukierunkowanych na uzyskiwanie nowych odmian łubinu żółtego, gatunku szczególnie interesującego dla rolnictwa w kontekście aktualnych zmian klimatycznych.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione osiągnięcia naukowe pracy wnoszę o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski