



Poznań, 30.01.2024

Prof. dr hab. Piotr Ziółkowski
Pracownia Biologii Genomu
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Recenzja pracy doktorskiej Pana Serhii'a Mykhailyka

Rozprawa doktorska Serhii'a Mychajlyka dotyczy wybranych aspektów ewolucji genów 35S rRNA u allotetraploidów *Brachypodium hybridum*. Doktorant wykorzystał w tym celu obszerny zbiór naturalnych linii *B. hybridum* pochodzących głównie z krajów basenu Morza Śródziemnego i Bliskiego Wschodu, z wyraźną nadreprezentacją linii z Izraela. Analizy obejmowały szereg technik cytogenetycznych (FISH na chromosomach metafazowych lub jądrach interfazowych), molekularnych (RT-qPCR, RT-CAPS, gCAPS, hybrydyzacja Southern, klonowanie molekularne, sekwencjonowanie Sangera i Illumina) oraz bioinformatycznych w celu możliwie kompleksowego scharakteryzowania badanych genów. Powstawanie allopoliploidów i formowanie zależności pomiędzy zestawami genów pochodzących od ich przodków jest istotnym zagadnieniem, szczególnie w kontekście traw, gdzie wiele gatunków, w tym pszenica heksaploidalna, przeszło taką właśnie drogę ewolucyjną. Dlatego podjęcie takiego tematu jak projekt doktorancki jest jak najbardziej uzasadnione.

Rozprawa ma strukturę typową dla prac doktorskich, na którą składają się Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski. Dodatkowo opatrzona jest streszczeniem w języku angielskim i polskim oraz wykazem literatury. Powiedziałbym, że całość jest dobrze wyważona, z odpowiednią ilością miejsca poświęconego poszczególnym elementom i dostosowanym poziomem szczegółowości. Całość pracy jest napisana w bardzo przejrzysty i



przystępny sposób, a ilustracje zostały przygotowane starannie, dzięki czemu lektura pracy była przyjemnością.

We Wstępie kandydat zamieścił podstawowe informacje na temat traw, skupiając się na *Brachypodium*, opisał organizację genów rRNA, następnie krótko omówił niektóre aspekty poliploidii u traw, ze szczególnym uwzględnieniem dominacji genomu. Druga część Wstępu była w całości poświęcona dominacji jąderkowej w roślinach i trawach. Choć nie mam zastrzeżeń do doboru tematów poruszonych w tym rozdziale, uważam, że autor mógł włożyć nieco więcej wysiłku w omówienie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za homogenizację genów rDNA.

Cele zostały również sformułowane prawidłowo i trafnie określają wyzwania badawcze, jakie postawił przed sobą doktorant. Materiały i metody zostały opisane z dużą dbałością o szczegóły, co z pewnością pozwoli na odtworzenie przeprowadzonych doświadczeń. Mam drobne zastrzeżenia do Tabeli 2, charakteryzującej poszczególne linie *Brachypodium* użyte w analizie: O ile rozumiem, że podanie współrzędnych GPS jest najdokładniejszym sposobem przedstawienia źródła genotypów, to na potrzeby recenzentów, którzy prawdopodobnie nie zajmują się hobbistycznie kartografią, przydałoby się także wskazanie kraju pochodzenia. Dla pracy użyteczna byłaby też mapa z zaznaczonymi lokalizacjami poszczególnych linii, choć zdaję sobie sprawę, że w przypadku niektórych z nich znana jest jedynie przybliżona lokalizacja.

Wyniki zostały opisane zwięźle i moim zdaniem były dość trudne w odbiorze. Zapewne po części wynika to z faktu, że zawierają one obszerną dokumentację, co utrudnia czytelnikowi ich analizę. Uważam również, że ryciny 2-4, które pokazują różnice w budowie subgenomu D i S 35S rDNA, należałoby umieścić bezpośrednio przed przedstawieniem wyników danego eksperymentu, a nie w dziale Materiały i metody. Niemniej jednak należy podkreślić, że zebrane wyniki są bardzo informatywne i charakteryzują się wysoką jakością. W niektórych przypadkach przydatne byłoby uwzględnienie w analizie dodatkowych replikacji, np. w doświadczeniach opartych na analizie restrykcyjnej produktów PCR (ryc. 25) efektywność trawienia enzymatycznego zależy od ilości inhibitorów zawartych w trawionej próbce, stąd wyniki dla pojedynczego powtórzenia mogą być nieprecyzyjne. Drzewa filogenetyczne pokazane na ryc. 27 nie są dla mnie do końca jasne – wydaje się, że autor nie wyjaśnił dostatecznie tej analizy, jak też nie udało mi się znaleźć żadnej



interpretacji tych analiz. Ogólnie jednak wyniki uzyskane przy użyciu bardzo różnych technik całkiem dobrze się ze sobą łączą, tworząc spójną historię. Najbardziej intrygujące są wyniki pokazujące różnice w profilach ekspresji obu form 35S rRNA w liniach ABR113, 3-7-2 i 2.2.2 (ryc. 34).

Dyskusja jest bardzo dobrze napisana, logicznie łącząc poszczególne wyniki i odnosząc je do danych literaturowych. Interpretacja wyników nie budzi z mojej strony poważnych zastrzeżeń, a wnioski wyciągnięto prawidłowo. Jedyne, czego mi zabrakło w Dyskusji, to próba powiązania wyników dotyczących struktury i aktywności transkrypcyjnej genów 35S rRNA z powiązaniem filogenetycznymi pomiędzy badanymi akcesjami. Byłoby to o tyle ciekawe, że jak zauważa autor, powstawanie *B. hybridum* miało miejsce w historii co najmniej dwukrotnie, a zdarzenia te dzieliło ponad 1 milion lat ewolucji. Czy wiadomo coś na temat powiązań filogenetycznych pomiędzy poszczególnymi liniami wykorzystanymi w badaniu i czy byłoby możliwe sklasyfikowanie ich pod względem czasu hybrydyzacji genomu? W przypadku braku danych umożliwiających taką klasyfikację istotne wydaje się przeprowadzenie analiz mających na celu określenie zależności filogenetycznych pomiędzy badanymi grupami, choć prawdopodobnie wykracza to poza zakres niniejszej pracy doktorskiej.

Warto w tym miejscu nadmienić, że w pracy opartej na sekwencjonowaniu fragmentu genu chloroplastowego *trnLF* przedstawiono zależności filogenetyczne pomiędzy analizowanymi akcesjami. Nie wykorzystano ich jednak później do interpretacji wyników innych niż rola genomu matczynego w aktywności rDNA. Chociaż wartości bootstrap w drzewie filogenetycznym są niskie, jedno z rozgałęzień ma wysoką wartość bootstrap (zaznaczone czerwonym kółkiem na ryc. 30), dlatego warto byłoby spróbować zinterpretować wyniki aktywności transkrypcji rRNA w oparciu o te dane.

Geny kodujące rRNA występują w setkach i tysiącach kopii i wykazują wysoki poziom ekspresji. Z własnego doświadczenia wiem, że stosunkowo łatwo jest o zanieczyszczenie próbek rRNA, co może mieć katastrofalne skutki dla analiz opartych na PCR i RT-PCR. Czy autor podczas interpretacji wyników wziął pod uwagę możliwość przypadkowego zanieczyszczenia i jakie podjął kroki, aby temu zapobiec?



Doktorant na potrzeby swoich analiz przyjął, że *B. hybridum* może zawierać geny rRNA o strukturze analogicznej do tej występującej u *B. stacei* i *B. distachyon*. Czy są dostępne syntetyczne hybrydy tych dwóch gatunków? Ich stworzenie i wykorzystanie w badaniach ewolucji genów rRNA byłoby bardzo cenne. Z drugiej strony naturalny *B. hybridum* powstał w odległej przeszłości ewolucyjnej, więc współczesne *B. distachyon* i *B. stacei* nie reprezentują genomów składowych *B. hybridum* w ścisłym znaczeniu. Czy doktorant mógłby omówić potencjalne konsekwencje tego faktu dla interpretacji jego wyników?

Jak już wspomniałem, praca została przygotowana bardzo starannie i nie znalazłem żadnych błędów ani pomyłek. Doktorant wydaje się być dobrze zorientowany w temacie swoich badań i biegle posługuje się odpowiednią literaturą naukową. Analiza i interpretacja wyników jest wzorowa i świadczy o dużej dojrzałości naukowej autora. Podsumowując, pragnę stwierdzić, że bardzo wysoko oceniam pracę przygotowaną przez Pana Serhii'a Mychajlyka. Eksperymenty wykonane w ramach projektu doktoranckiego charakteryzują się wysoką jakością i w pełni potwierdzają kompetencje naukowe kandydata. Dlatego też, w mojej opinii, niniejsza rozprawa spełnia warunki nałożone przez prawo, określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023/742). Dlatego rekomenduję Radzie Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach dopuszczenie Pana Serhii'a Mychajlyka do kolejnych etapów postępowania w celu nadania mu stopnia doktora.

Z poważaniem,

Prof. Piotr A. Ziolkowski