

Poznań, 31.10.2023

Dr hab. inż. Alina Liersch

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowy Instytut Badawczy

Oddział w Poznaniu

ul. Strzeszyńska 36

60-479 Poznań

### **Recenzja rozprawy doktorskiej Pana magistra inżyniera Adriana Cyplika**

#### **pt. „Metody estymacji interakcji wyższych rzędów genów determinujących cechy ilościowe na podstawie obserwacji fenotypowych i markerów molekularnych”**

Recenzję wykonano na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo nr XXXX/4/2023 z dnia 29 września 2023 roku, w oparciu o wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity, Dz.U. z 2021 r. poz.478).

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana magistra inżyniera Adriana Cyplika została wykonana pod kierunkiem Pana dr hab. Jana Bocianowskiego, profesora UPP, pracownika Katedry Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach Szkoły Doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w Katedrze Metod Matematycznych i Statystycznych.

#### **Najważniejsze fakty z życiorysu zawodowego Doktoranta**

Mgr inż. Adrian Cyplik ukończył II stopniowe studia na Uniwersytecie Przyrodniczym w Poznaniu, na Wydziale Rolnictwa i Bioinżynierii w 2018 r. uzyskując tytuł magistra inżyniera. Doktorant po ukończeniu studiów rozpoczął anglojęzyczne studia III stopnia w ramach Szkoły Doktorskiej UPP w zakresie Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo. W trakcie studiów III stopnia Doktorant prezentował wyniki badań jako pierwszy autor lub współautor w 15 artykułach naukowych, z których dziewięć zostało opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się w bazie JCR, a ich sumaryczny IF wynosi 29,864 wraz z publikacjami wchodzącymi w skład pracy doktorskiej. Ponadto swoje badania przedstawił w formie plakatów na dwóch konferencjach krajowych. Pan mgr inż. Adrian Cyplik realizował grant (NCBiR) w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój na lata 2014-2020 oraz podnosił swoje kwalifikacje uczestnicząc w szkoleniach i warsztatach organizowanych przez instytucje krajowe.

#### **Ocena formalna rozprawy**

Podstawą ocenianej dysertacji są cztery spójne tematycznie oryginalne publikacje naukowe oraz poprzedzające je opracowanie w języku polskim. Przedstawione do oceny publikacje ukazały się

w latach 2022-2023 w recenzowanych międzynarodowych czasopismach, indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*) oraz umieszczonych w wykazie czasopism naukowych MEiN.

Wartości sumarycznego współczynnika wpływu (Impact Factor, IF) dla tych czasopism wahają się od 2,652 do 5,6; a sumaryczny IF (według roku opublikowania) wynosi 14,691, co świadczy o wysokim poziomie naukowym prac wchodzących w skład osiągnięcia i zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów czasopism naukowych. Łączna liczba cytowań prac wynosi 11 (stan z dnia 27.10.2023), natomiast suma punktów MEiN – 520. Należy zauważyć, że publikacje te ukazały się niedawno i w najbliższych latach liczba cytowań zapewne wzrośnie.

Wszystkie prace są dwu lub wieloautorskie i w każdej z nich Doktorant jest pierwszym autorem, a dodatkowo w jednej współautorem korespondencyjnym (publikacja 3). Biorąc pod uwagę wymóg prawny oceny indywidualnego wkładu Doktoranta w powstanie publikacji (Dz.U. 2014 poz. 1383; §6 ust 5 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014) spełnia on to kryterium. Według pisemnych oświadczeń dołączonych przez wszystkich współautorów (zawartych na końcu rozprawy), wkład Doktoranta w powstawanie czterech publikacji był znaczący. Rola Doktoranta polegała na przygotowaniu projektu badań, opracowaniu założeń i metod, przeprowadzeniu badań, analizie, interpretacji i dyskusji wyników oraz w przygotowaniu i korekcie w/w manuskryptów, co potwierdza jego istotny udział zarówno w prowadzonych badaniach jak również w powstawaniu końcowej wersji artykułów. Jest to niewątpliwie znaczący dorobek naukowy, osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora.

Tytuł rozprawy został sformułowany właściwie i dobrze odpowiada tematyce przeprowadzonych badań i w/w publikacji. Całość dysertacji przygotowano skrupulatnie, a jej układ jest czytelny i zgodny z wymogami formalnymi wydań rozpraw doktorskich.

#### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska została przygotowana w języku polskim. Opis cyklu publikacji (liczący 76 stron) obejmuje poza stroną tytułową, wykazem prac naukowych wchodzących w skład rozprawy, spisem treści, następujące rozdziały: Wykaz skrótów, Streszczenie, Summary, Wprowadzenie, Hipotezę badawczą i cele pracy doktorskiej, Materiały i metody, Omówienie wyników i dyskusję, Podsumowanie oraz Spis literatury. W dalszej części znajdują się wydruki czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia dotyczące udziału Doktoranta i współautorów w powstawaniu prac.

W rozdziale Wprowadzenie Autor przedstawia zagadnienia dotyczące hodowli roślin rolniczych. Przedstawiono najważniejsze cele związane ze współczesną hodowlą wynikające z konieczności zaspokojenia potrzeb rosnącej światowej populacji, zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego oraz dostosowania współczesnych odmian do zmieniającego się klimatu. Podkreślono konieczność poprawy składu chemicznego nasion i owoców uprawianych na cele spożywcze (błonnik,

witamina, minerały) jak również hodowli roślin uprawianych na cele niespożywcze stanowiące cenny surowiec dla różnych gałęzi przemysłu (biopaliwa, przemysł chemiczny, farmaceutyczny). Autor przedstawia klasyczne (tradycyjne) i nowoczesne metody hodowlane wykorzystywane w tworzeniu nowych bardziej produktywnych i odpornych na stresy biotyczne i abiotyczne odmian. Kolejny podrozdział poświęcony jest cechom ilościowym, które jako cechy złożone determinowane są przez wiele genów a ich ekspresja zależy od interakcji genotypu ze środowiskiem. Następnie Doktorant wskazuje na nowoczesne możliwości badania uwarunkowań genetycznych różnych cech fenotypowych poprzez identyfikację sprzężeń markerów z cechami, a w przypadku cech ilościowych o złożonych uwarunkowaniach genetycznych badania asocjacyjne całego genomu czy tworzenie map genetycznych. W dalszej części przedstawiono zagadnienia związane z interakcją genetyczną, szczegółowo omawiając rodzaje interakcji genetycznych, podkreślając znaczenie badań nad interakcjami genetycznymi wyższego rzędu. Podejmowane prace nad interakcjami wyższego rzędu są zbieżne z aktualnymi celami hodowlanymi roślin rolniczych ze względu na konieczność zrozumienia czynników wpływających na ekspresję cech ilościowych bezpośrednio związanych z plonowaniem jak i tolerancją na stresy abiotyczne (szczególnie suszę) i biotyczne.

W kolejnym podrozdziale określono cel pracy i sprecyzowano hipotezę badawczą, która zakładała, że wykorzystując obserwacje fenotypowe oraz markery molekularne, można estymować efekty interakcji wyższych rzędów genów determinujących cechy ilościowe. Sprecyzowano główny cel badań, którym było opracowanie estymatorów parametru związanego z efektem potrójnej interakcji genów determinujących cechy ilościowe na podstawie obserwacji tylko fenotypowych oraz z uwzględnieniem obserwacji genotypowych. Dodatkowym celem badań było analityczne, numeryczne i symulacyjne porównanie zaproponowanych metod estymacji.

Materiały i metody wykorzystane w pracy opisano w kolejnej części. Przedmiotem analiz było odpowiednio: 150 linii podwojonych haploidów jęczmienia (zbiór I, publikacja 1), 145 podwojonych haploidów (DH) jęczmienia (zbiór II, publikacja I), 252 linie wsobne kukurydzy (publikacja II), 94 linie podwojonych haploidów pszenicy (publikacja III). W badaniach zastosowano zaawansowane metody estymacji obejmujące oszacowanie na podstawie fenotypu i na podstawie obserwacji genotypowych. Dodatkowo oszacowanie na podstawie obserwacji genotypowych uwzględniało selekcję markerów (2 warianty), regresję nieważoną i regresję ważoną. Interesująca jest metoda badań symulacyjnych Monte Carlo porównująca fenotypowe i genotypowe oszacowania całkowitego efektu *aaa* interakcji  $gen \times gen \times gen$  (publikacja IV) przy zastosowaniu nieważonej i ważonej wielokrotnej regresji liniowej. W podrozdziale Wyniki zostały opisane najważniejsze wyniki uzyskane w poszczególnych publikacjach.

W pierwszej pracy przedstawiono analityczne i numeryczne porównanie metod oszacowania całkowitych efektów interakcji *aaa*. Porównanie numeryczne dla I zbioru danych fenotypowych (150

linii DH haploidów jęczmienia z kombinacji Steptoe × Morex; 8 cech/16 środowisk) i II zbioru danych (145 linii DH z kombinacji Harrington × TR306; 7 cech/9 środowisk) przeprowadzono niezależnie, a porównanie analityczne wykonano na podstawie danych markerowych umieszczonych na mapach sprzężeń opracowanych dla każdej z populacji mapującej jęczmienia. Uzyskane wyniki pokazały, że oszacowany całkowity efekt interakcji addytywno × addytywno × addytywnej w większości przypadków był mniejszy dla metody genotypowej niż całkowity efekt interakcji *aaa* obliczony jedynie na podstawie obserwacji fenotypowych.

Badania opisane w drugiej publikacji koncentrowały się na ocenie cech fenotypowych kukurydzy w doświadczeniach polowych. Na podstawie jednorocznych badań 252 linii wsobnych (RI) kukurydzy (151 linii RI - HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, 101 linii RI – Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.) oceniono efekt addytywnego działania genów (*a*), efekt epistazy (*aa*) i całkowity efekt interakcji addytywno × addytywno × addytywnej (*aaa*) dla 9 cech fenotypowych. Badania przeprowadzono w dwóch miejscowościach. Stwierdzono pozytywne, istotne statycznie całkowite efekty addytywne działania genów dla wszystkich badanych cech 252 linii kukurydzy w obu miejscowościach. Obserwowany efekt interakcji potrójnej (*aaa*) był istotny statystycznie w 24 z 36 (67%) obserwowanych przypadków, natomiast istotny efekt epistazy stwierdzono w 21 z 36 (58%) badanych przypadków. Wykazano, że dla większości badanych cech wartości estymatorów *aa* i *aaa* miały różny znak pomiędzy lokalizacjami i pochodzeniem analizowanego materiału, z wyjątkiem cechy - liczby rzędów ziarna dla której wartości estymatorów były zawsze dodatnie we wszystkich badanych przypadkach.

W trzeciej publikacji zaproponowano i przetestowano nową metodę mającą na celu poprawę estymacji parametru związanego z interakcją QTL×QTL×QTL, którą było zastosowanie ważonej regresji wielokrotnej tj. inną niż testowano w Publikacji I (tradycyjna regresja nieważona do oszacowania efektów interakcji *aaa* uzyskanych na podstawie obserwacji markerów molekularnych). Do numerycznego porównania trzech metod oszacowania interakcji *aaa*: metody fenotypowej, metody regresji nieważonej i regresji ważonej posłużyły dane fenotypowe (zawartość fenoli) uzyskane z badań populacji mapującej 94 linii podwojonych haploidów pszenicy (CSDH) i opublikowanej wcześniej mapy sprzężeń o długości 4040 cM, zawierającej 920 markerów molekularnych (Czyczyło-Mysza i in. 2013). Przeprowadzone porównanie genotypowego oszacowania efektów interakcji *aaa* dla wyznaczonych poszczególnych trójek QTL i estymacji efektów ich interakcji QTL×QTL×QTL na podstawie nieważonej (*aaa<sub>gu</sub>*) i ważonej (*aaa<sub>gw</sub>*) wielokrotnej regresji liniowej wskazuje, że zastosowanie regresji ważonej poprawiło (co do wartości bezwzględnej) ocenę parametru *aaa<sub>gw</sub>* w porównaniu z oszacowaniami bazującymi na obserwacjach fenotypowych *aaa<sub>p</sub>*.

Badania opisane w czwartej z cyklu publikacji są pierwszym doniesieniem na temat porównania metod oszacowania fenotypowego i genotypowego (modele regresji wielokrotnej

nieważonej i dwie modyfikacje ważonej) efektów interakcji addytywno  $\times$  addytywno  $\times$  addytywnej za pomocą badań symulacyjnych Monte Carlo. Badania te są bardzo ważnym dopełnieniem badań przedstawionych w trzech pierwszych artykułach. Porównanie symulacyjne Monte Carlo przeprowadzono dla 84 kombinacji zakładanych parametrów odzwierciedlające różne sytuacje eksperymentalne. Różnice między oszacowaniami fenotypowymi a genotypowymi były zawsze dodatnie i ogólnie mniejsze gdy zakładano różne efekty trójek QTL $\times$ QTL $\times$ QTL. Na podstawie przeprowadzonych badań symulacyjnych wykazano, że wartości estymatorów przy zastosowaniu regresji ważonej były zawsze większe niż wartości bazujące na regresji nieważonej. Generalnie estymacje uzyskane za pomocą modelu regresji ważonej bliższe estymacjom uzyskanym metodą fenotypową.

Siódmy podrozdział stanowi podsumowanie badań, które zostały poprzedzone ogólną dyskusją łączącą wszystkie cztery publikacje. Prezentuje ona dobry poziom naukowy i dowodzi znajomości tematu, a także umożliwia porównanie uzyskanych w ramach dysertacji wyników na tle obecnych doniesień literaturowych. Badania podsumowano ośmioma wnioskami, które mają pełne uzasadnienie w uzyskanych wynikach pracy. Pozytywnie zweryfikowano hipotezę o możliwości estymowania efektów interakcji wyższych rzędów genów determinujących cechy ilościowe. Opracowanie zakończono spisem literatury obejmującym 125 pozycji wyłącznie anglojęzycznych, z których ponad 45 to literatura opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat.

Wchodzące w skład rozprawy doktorskiej cztery publikacje były już uprzednio recenzowane przez międzynarodowych recenzentów. Prace stanowią logiczny i spójny układ, a wykorzystane podczas realizacji pracy metody i analizy statystyczne są poprawne i nie budzą zastrzeżeń merytorycznych.

Z obowiązku recenzenta wspomnę o drobnych usterkach znajdujących się w samej rozprawie doktorskiej:

- w wykazie umieszczono KW masa tysiąca ziaren, a w pracy operowano skrótem TKW; GP (ang. *grain protein*) powinno być ang. *grain protein content*;
- „zawartość składników odżywczych” – sugerowałabym zastąpienie np. poprzez „skład chemiczny nasion”, podobnie „materiały przemysłowe” może zmienić na „ surowiec dla różnych gałęzi przemysłu”, metody hodowli roślin „konwencjonalne” zastąpić poprzez „klasyczne”;
- 6.2.3 – pominięto 1 cechę - masę ziarna z kolby, w opisie badano nie 8 ale 9 cech;
- 7.1.1.1, str. 35 powinno być Tabela 5 (jest Tabela 3); 7.1.2. str. 37 w nawiasie podano dane dla 4 cech, a wymieniono trzy cechy fenotypowe kukurydzy;
- 7.1.1.4 czy zamiast  $aaa_{gw1} > aaa_{gw2}$  (Tabela 11) nie powinno być  $aaa_{gw1} < aaa_{gw2}$  jak wynika z opisu i danych w Tabeli 11

Powyższe zastrzeżenia nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej pracy.

Pytania dotyczące pracy:


1. Ze względu na coraz szersze stosowanie Nowych Technik Hodowlanych (NBT) czy nie istnieje obawa nad zawężeniem zmienności w obrębie uprawianych gatunków roślin i materiałów kolekcyjnych, ponieważ szacuje się, że w ostatnich latach zniknęło około ¼ odmian, które były uprawiane od wielu lat.
2. Badania w publikacjach I-III przeprowadzono na roślinach zbożowych. Czy jest możliwe przeprowadzenie podobnych analiz, na roślinach dwuliściennych oraz symulacji Monte Carlo dla roślin allotetraploidydnych np. *Brassica napus* ( $2n = 38$ ) (AACC) powstałym poprzez spontaniczną hybrydyzację i poliploidyzację pomiędzy rzepikiem (*B. rapa*, AA,  $2n = 20$ ) i kapustą (*B. oleracea*, CC,  $2n = 18$ )?
3. W III publikacji, Tabela 9 dlaczego w oszacowaniu genotypowych interakcji addytywno  $\times$  addytywno  $\times$  addytywnej dla trójek QTLxQTLxQTL w dwóch trójkach znajdowały się identyczne geny odpowiednio: QTL1 (LG) i QTL2 (LG) – gwm165.3 (4A) gwm 165.3 (4A); wPt-0391 (4B) wPt-0391 (4B) kiedy we wszystkich innych przypadkach były to różne trójki genów QTLxQTLxQTL?

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej uważam: (1) opracowanie estymatorów parametru związanego z efektem interakcji potrójnej genów determinujących cechę ilościową QTLxQTLxQTL, (2) porównanie analityczne, numeryczne i symulacyjne metod fenotypowej i genotypowej estymacji całkowitego efektu interakcji, (3) potwierdzenie, że metoda bazująca na obserwacjach tylko fenotypowych daje większe wartości niż metoda genotypowa. Za wartościowe uważam również zaproponowanie modyfikacji metody estymacji genotypowej efektu interakcji wyższego rzędu (*aaa*), a także ich wpływu na cechy ilościowe opartej na ważonej wielokrotnej regresji liniowej.

### **Wniosek końcowy**

Przedstawioną mi w formie spójnego tematycznie zbioru czterech artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych rozprawę doktorską Pana mgr inż. Adriana Cyplika oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego, a kompleksowe opracowanie poszerza aktualny stan wiedzy. Uzyskane przez Doktoranta wyniki mają duże znaczenie praktyczne. Mogą bezpośrednio przyczynić się do zwiększenia efektywności selekcji materiałów hodowlanych dzięki zastosowaniu narzędzi statystycznych do charakterystyki QTL determinujących cechy ilościowe.

W mojej ocenie praca doktorska mgr inż. Adriana Cyplika pt. „Metody estymacji interakcji wyższych rzędów genów determinujących cechy ilościowe na podstawie obserwacji fenotypowych i markerów molekularnych” – zbiór czterech publikacji, spełnia kryteria stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz.U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669) (tekst jednolity Dz.U. z 2021 r. poz. 478) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo z prośbą o dopuszczenie mgr inż. Adriana Cyplika do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.



*Dr hab. inż. Alina Liersch*