Milton Keynes, 23. 01. 2022

Prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuszewskiej pt. „Ocena zróżnicowania genetycznego populacji mapujących jako podstawa konstrukcji mapy genetycznej *Salix* ssp." Praca została wykonana w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców pod kierunkiem dr. hab. inż. Jerzego Przyborowskiego prof. UWM.

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy szerokiej problematyki związanej z możliwością wielostronnego wykorzystania gatunków należących do rodzaju *Salix* ssp., do produkcji biomasy jako alternatywne źródła energii, charakteryzujących się odpowiednimi właściwościami drewna lub przeznaczonymi do produkcji wyrobów meblarskich a także w celach farmakologicznych.

Doktorantka zwróciła uwagę na realne możliwości uzyskiwania na drodze genetyczno-hodowlanej wyższego plonu biomasy poprzez poznanie dziedziczenia cech struktury plonu. Otrzymanie odpowiednich mieszańców międzygatunkowych o wysokiej odporności na patogeny prowadzić będzie do uzyskanie materiałów wyjściowych i wyprowadzenia odmian przydatnych do zakładania odpowiednich szybko rotujących plantacji, przydatnych dla przemysłu.

Wyhodowanie odpowiednich odmian jest zadaniem długofalowym, wymagającym znajomości skomplikowanej i nie do końca opracowanej systematyki rodzaju *Salix*. Z jednej strony łatwość pozyskiwania mieszańców międzygatunkowych, zdolność rozmnażania wegetatywnego, ale z drugiej strony specyfika biologii kwitnienia i zapylania (często dwupienność) stawiają badacza przed trudnym wyzwaniem. Otrzymanie odpowiednich populacji mapujących, które umożliwią poznanie sposobu dziedziczenia ważnych cech jest niezbędnym krokiem i niełatwym zadaniem.

Wykorzystanie metod biotechnologicznych umożliwia nie tylko wyprowadzenie roślin z niedojrzałych zarodków przy wykorzystaniu kultur *in vitro,* ale także zastosowanie

odpowiednich markerów molekularnych i powiązanie ich z poligenicznymi cechami struktury plonu (*QTL*). Ma to istotne znaczenie w tworzeniu nowych lepiej plonujących odmian z rodzaju *Salix* ssp., które są najczęściej mieszańcami międzygatunkowymi mogącymi mieć wszechstronne zastosowanie.

Uważam, że podjęte przez mgr Annę Kuszewską badania są ważne i interesujące pod względem wartości poznawczych i aplikacyjnych oraz bardzo dobrze wpisują się w obecne trendy badawcze.

Oceniana praca doktorska obejmuje 144 strony, w tym 26 tabel, 21 rysunków, 8 fotografii. Praca zawiera następujące rozdziały: Na początku pracy zamieszczono spis treści, spis rysunków, tabel i fotografii oraz stosowane skróty. Na treść pracy składają się: Wstęp i Cel Pracy, Przegląd Piśmiennictwa, Materiał Badawczy i Metody, Wyniki, Dyskusja Wyników, Wnioski, Aneks zawierający: tabele sekwencji markerów RAPD oraz ISSR wykorzystanych w badaniach własnych, wyniki cech struktury plonu (liczba pędów, średnica pędu wiodącego, wysokość pędu wiodącego) dla populacji mapujących P4 i P5, schematy 31 grup sprzężeń wygenerowanych na podstawie analiz roślin dla obu populacji mapujących oraz fotografie doświadczeń z plantacji i podczas prowadzonych pomiarów biometrycznych. W rozdziale Literatura podano wykaz cytowanej literatury (w większości obcojęzycznej), który zawiera 250 pozycji. Na końcu pracy zostały przedstawione streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim.

Poszczególne rozdziały zostały podzielone na podrozdziały co bardzo poprawiło czytelność zawartych informacji i umożliwiło przedstawienie treści rozprawy jako logiczną całość. Praca została napisana poprawnym językiem.

Tytuł pracy odpowiada treści rozprawy. Po wstępie Autorka przedstawiła jasno sprecyzowane cele badań, które były konsekwentnie realizowane w kolejnych etapach badań.

Przegląd Piśmiennictwa został podzielony na 4 główne kierunki zagadnień. Pierwszy dotyczy problematyki związanej z zagadnieniami pozyskiwania biomasy i samymi roślinami energetycznymi. Autorka omawia podstawowe składniki drewna (celulozę, hemicelulozę oraz ligninę) i możliwości uzyskiwania z nich cennych biopaliw (bioetanol lignocelulozowy, bioetanol czy biodiesel oraz borowodór czy biobutanol). Zwiększanie upraw szybkorosnących roślin bioenergetycznych może stanowić substytut wyczerpujących się paliw kopalnych. Autorka zwróciła uwagę na możliwość pozyskiwania surowca energetycznego z trzech grup roślin – drzewa i krzewy, trawy oraz byliny. Najważniejsze cechy to dynamiczny przyrost

pędów rocznych, duża liczba nowych odrostów na karpie i odporność na patogeny oraz wysoka wartość opalowa.

Doktorantka następnie omówiła w sposób przystępny skomplikowaną i nie do końca opracowaną systematykę rodzaju *Salix* L. Przedstawiła rozmieszczenie geograficzne podrodzajów, problem poziomu ploidalności, biologię kwitnienia i zapylania. Omówiła zagadnienia związane z tworzeniem mieszańców międzygatunkowych w warunkach naturalnych. Zaznaczyła, że w Polsce opisano około 30 gatunków należących do rodzaju *Salix*. W tym gatunek wierzby wiciowej, który uważany jest za perspektywiczny z przeznaczeniem na cele energetyczne. Autorka przedstawiła również charakterystykę botaniczną *Salix vinimalis* oraz *S. schwerinii,* gatunki i ich mieszańce najczęściej wykorzystywane w europejskich programach badawczych. Ważna problematyka hodowli *Salix* została przedstawiona bardzo obszernie, co jest zrozumiałe, ponieważ wiąże się bezpośrednio z realizacją postawionych celów pracy. Dotychczasowe osiągnięcia związane z wybranymi systemami markerów DNA i zastosowanie ich w analizach molekularnych oraz mapowaniu genetycznym rodzaju *Salix* zostały szczegółowo opisane w podrozdziale 4. W tabeli 3 autorka podała zestawienie dotychczas opublikowanych wyników badań dotyczących mapowania u różnych gatunków z rodzaju *Salix*. Wyraźnie widać, że doktorantka świetnie jest zorientowana w omawianych zagadnieniach, co wiąże się bezpośrednio z celem przedstawionej do oceny pracy.

Cały, obszerny rozdział Przegląd Piśmiennictwa został napisany interesująco i przybliża najważniejsze dotychczasowe osiągnięcia, których wyniki można spotkać w światowej literaturze.

Kolejny rozdział pracy doktorskiej **Materiał Badawczy i Metody** dotyczy otrzymania populacji mapujących pokolenia P4 i P5. Szczegółowy opis wybranych form rodzicielskich i przedstawiony w sposób klarowny na schemacie (ryc. 4) dokładne pochodzenie obu populacji mapujących. Rośliny mieszańcowe pokolenia F_1 oraz badanych populacji zostały wyprowadzone dzięki zastosowaniu kultur *in vitro* niedojrzałych zarodków. Z każdego mieszańca otrzymane rośliny rozmnożono również wykorzystując kultury *in vitro* co pozwoliło na utworzenie klonów. Następnie autorka przedstawiła szczegółowo sposób założenia doświadczeń polowych oraz wykonane pomiary biometryczne.

W podrozdziale **Metody Badań Molekularnych** w sposób klarowny zostały omówione: izolacja genomowego DNA, ocena jakościowego i ilościowego DNA oraz sposób doboru starterów RAPD-PCR i ISSR-PCR a także kryteria wyboru do dalszych analiz 58

starterów RAPD i 5 starterów ISSR. Zostały szczegółowo omówione zastosowane analizy statystyczne dla danych biometrycznych, analizy wariancji, oceny zależności pomiędzy cechami i wielowymiarową analizę składowych głównych. Opracowanie wyników analiz molekularnych zostało dokładnie opisane a zastosowane odpowiednich programów umożliwiło określenie indeksu zmienności, poziomu heterozygotyczności, procentu loci polimorficznych i liczbę alleli a zastosowanie programu AMOVA pozwoliło na ocenę zmienności molekularnej. W dalszym ciągu tego rozdziału przedstawiono w jaki sposób przeprowadzono konstrukcję map genetycznych. Kolejno omówionym krokiem była identyfikacja QTL-i, co w efekcie umożliwiło Autorce przedstawienie graficznie dla każdej z analizowanych cech, mapy sprzężeń oraz loci cech ilościowych.

Rozdział **Wyniki** został opisany na 27 stronach i podzielony na podrozdziały co pozwoliło na połączenie w grupy kolejno uzyskane wyniki, tworząc czytelny układ. Ten obszerny rozdział został napisany przystępnie. Warunki meteorologiczne panujące w okresie trwania doświadczenia zostały szczegółowo omówione, a na rysunku 11 oraz w tab. 5 i 6 przedstawiono przebieg zmienności temperatur i opadów z okresu 2010 – 2017. Dane te mają bezpośredni związek z omówionymi wynikami dotyczącymi zmienności analizowanych cech, cech biomasy i plonu biomasy badanych populacji. Autorka szczegółowo omówiła otrzymane wyniki cech struktury plonu dla roślin pokolenia P4 i P5 w kolejnych latach badań. Ciekawe są wyniki wielowymiarowej analizy cech: wysokości roślin, średnicy pędu, rozkrzewienia i masy roślin populacji mapującej P5. Umożliwiło to wskazanie procentowego udziału cech w całkowitej zmienności.

Otrzymane wyniki analiz molekularnych obu populacji mapujących, które dokładnie zostały opisane w całym podrozdziale 6.3. świadczą o bardzo dobrym opanowaniu zagadnień genetyki molekularnej przez doktorantkę. Wyróżnienie grup sprzężeń, czyli przeprowadzenie mapowania genetycznego, określenie zmienności i podobieństwa genetycznego, grup sprzężeń obu populacji mapujących i co najważniejsze określenie liczby QTL-i związanymi z cechami struktury plonu wskazuje, że cel pracy został osiągnięty.

Bardzo ciekawie została przeprowadzona **Dyskusja Wyników**. Mgr Anna Kuszewska w interesujący sposób przeprowadziła konfrontacje wyników własnych badań z osiągnięciami innych autorów zamieszczonymi przeważnie w najnowszych publikacjach. Sposób przedstawienia tego rozdziału potwierdza dużą znajomość tematyki badawczej, a także

wnikliwa analiza własnych wyników badań potwierdza Jej predyspozycję do dalszej pracy naukowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka sformułowała 9 wniosków, które są związane z postawionym celem pracy i odzwierciedlają bardzo dobrze uzyskane wyniki badań.

Na szczególne podkreślenie zasługuje powiązanie w logiczną całość kolejnych rozdziałów: Wyniki, Dyskusja Wyników i Wnioski.

Uwagi

Analizując rozprawę doktorską zanotowałam kilka uwag i nieścisłości. Pierwsza uwaga dotyczy stosowanego przez Autorkę terminu „okres wegetacyjny." Nie jest to określenie właściwie, które zostało zastosowane do prowadzonych obserwacji badanych roślin, czyli „okresu wegetacji". Okres wegetacyjny - to określenie dotyczy całego okresu, kiedy mamy do czynienia z wegetacją. Druga uwaga dotyczy - kultury *in vitro* - powinny być pisane kursywą, ponieważ jest to termin pochodzący z łaciny. Trzecia uwaga dotyczy często używanego przez autorkę określenia „przynależniony" np. do rodzaju, czy jak w tytule na rys. 19 – chyba lepiej stosować termin „należący" czy „zaliczany". W tabeli 1 Autorka podaje przykłady mieszańców międzygatunkowych i gatunków rodzicielskich a nie samych krzyżowań, jako procesu technicznego co wynikałoby z tytułu. Drobne uwagi dotyczą pomyłek, które bez trudu powinny być usunięte przy przygotowywaniu pracy do druku. Autorka często stosuje skrót odm. zamiast całego słowa odmiana, która nie posiada skrótu. Na str. 9 przy wykazie skrótów InDel ang. *Insertion/Deletion* powinno być *Polymophism*. Aktorka w różnych miejscach w pracy używa terminów: sztobry, zrzezy, sadzonki moim zdaniem to ostatni termin jest bardziej prawidłowy.

W spisie literatury należałoby uwzględnić koniecznie stosowane zasady np. dotyczące kolejności zamieszczania danych bibliograficznych w przypadku tego samego pierwszego autora (jeden autor, dwóch autorów i wielu autorów). Następna uwaga dotyczy nazw czasopism w których ukazała się cytowana publikacja, zawsze powinny być napisane dużymi literami. Błędy zauważyłam w kilku pozycjach (22, 28, 50, 72,76,80, 104, 109, 120,129,139, 149, 153, 153, 161, 176, 187, 196, 207, 209, 225, 230, 231, 234, 237, 239, 244).

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że mgr inż. Anna Kuszewska wykazała się bardzo dużą wiedzą w zakresie podjętej tematyki, znajomością piśmiennictwa i metod badawczych oraz umiejętnością opracowywania i interpretacji wyników, co świadczy o Jej bardzo dobrym przygotowaniu do pracy naukowej. Zauważone niedociągnięcia, błędy i

sugestie mają charakter pomocniczy a przy przygotowywaniu pracy do druku w czasopiśmie naukowym, mogą być łatwo skorygowane lub uzupełnione.

Przedstawiona do recenzji praca jest bardzo interesująca stanowi ciekawe rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane wyniki mają bardzo duże znaczenie dla nauki oraz dla praktyki.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, które zostały określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (DZ.U. z 2003 r., Nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie pani mgr. inż. Kuszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz