Dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. nadzw.
Katedra Bioinżynierii
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Szczecin, dnia 21.01.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Kuszewskiej
pt. „Ocena zróżnicowania genetycznego populacji mapujących jako podstawa konstrukcji mapy genetycznej *Salix* spp."
wykonanej w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców
pod kierunkiem promotora dr. hab. Jerzego A. Przyborowskiego, prof. UWM

Recenzja pracy doktorskiej została wykonana na podstawie pisma z dnia 23.11.2021 roku przesłanego przez prof. dr. hab. Agnieszkę Pszczółkowską Przewodniczącą Rady Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo na Wydziale Rolnictwa i Leśnictwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, informującego o wszczęciu przez ww. Radę postępowania o nadanie stopnia doktora mgr inż. Annie Kuszewskiej.

Poszukiwanie nowych oraz optymalizacja obecnie dostępnych odnawialnych źródeł energii (OZE) należy do priorytetów działań większości gospodarek krajów naszego globu. Jest to podyktowane szybko postępującą degradacją środowiska naturalnego i katastrofalnymi skutkami powodowanymi nadmierną eksploatacją konwencjonalnych paliw kopalnych. Wykorzystanie biomasy roślinnej o udoskonalanych parametrach plonotwórczych pochodzącej z niskonakładowych upraw roślin energetycznych, w tym z rodzaju *Salix* pozyskiwanych w krótkich rotacjach (SRC), wpisuje się w te, tak bardzo istotne działania. Bogate zasoby genowe, duże zróżnicowanie genetyczne w obrębie rodzaju *Salix* oraz złożoność mechanizmu dziedziczenia istotnych pod względem cech użytkowych wzbudzają duże zainteresowanie badaczy poznaniem podłoża ich dziedziczenia. Coraz nowocześniejsze, dostępne techniki biologii molekularnej, w tym oparte o różne systemy markerowe pozwalają na skuteczną intensyfikację procesów hodowlanych w kierunku selekcji wysokoplonujących genotypów *Salix* oraz pozwalają na stwierdzenie ich zróżnicowania genetycznego.

Dlatego też, podjęte przez mgr inż. Annę Kuszewską badania dotyczące powyższych zagadnień są nie tylko ciekawe poznawczo, ale są też poszerzeniem wiedzy w zakresie selekcji i hodowli nowych form *Salix* ukierunkowanych na produkcję biomasy o najlepszych parametrach energetycznych. Poza tym, badania te mają niezwykle ważny aspekt utylitarny. W związku z powyższym, uważam wybór tematu recenzowanej rozprawy za bardzo trafny i jasno sprecyzowany.

Ocena formalna pracy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Anny Kuszewskiej pt. **Ocena zróżnicowania genetycznego populacji mapujących jako podstawa konstrukcji mapy genetycznej *Salix* spp."** obejmuje 144 strony, w tym 26 tabel, 21 rysunków, 8 fotografii oraz 250 pozycji literatury (w tym 232 pozycje anglojęzyczne). Układ pracy jest w zasadzie typowy dla tego typu naukowych opracowań eksperymentalnych i powszechnie stosowany. Nie budzi większych zastrzeżeń. Składa się z wyodrębnionych rozdziałów, tj. ze wstępu zakończonego celem pracy, przeglądu piśmiennictwa, materiału badawczego i metod, wyników (ich omówienia), dyskusji wyników oraz wniosków. Dodatkowym rozdziałem zaznaczonym w spisie treści jest aneks, w którym zamieszczonych zostało 15 tabel, 2 rysunki oraz 3 fotografie.

Z kolei niewyodrębnionymi częściami zamieszczonymi na początku pracy są spisy: tabel, rysunków i fotografii oraz skróty, a także literatura (spis) oraz streszczenia w językach: polskim i angielskim (abstract) zamieszczone na jej końcu.

Mam małe uwagi do tej części. Uważam, że wszystkie tabele, rysunki i fotografie zawarte w aneksie powinny być umieszczone w rozdziałach, których one dotyczą. Praca byłaby czytelniejsza. Aneks wówczas byłby zbędny. W spisie treści doprecyzowałbym nazwy rozdziałów: 5. Materiał badawczy i metody oraz 6. Wyniki, przez dodanie na końcu rozdziałów słowa „*badań*".

Ponadto, w spisie fotografii nr 2, 3 i 4 są błędnie podane strony ich zamieszczenia.

Ocena merytoryczna pracy

Tytuł rozprawy doktorskiej jest jasno sformułowany i nawiązuje do zawartych w niej treści. We **wstępie** Doktorantka umiejętnie i bardzo obszernie (może zbyt obszernie – 6 stron) wprowadza czytelnika w tematykę badawczą oraz uzasadnia podjęcie wybranego tematu. Na końcu stawia do realizacji jeden główny cel badań, tj. stworzenia podstaw naukowych służących do zbudowania systemu selekcji wspieranego markerami molekularnymi wykorzystywanego w hodowli twórczej *Salix* spp., ze szczególnym uwzględnieniem produkcyjności roślin.

Do zrealizowania celu głównego Autorka pracy postawiła dodatkowo cztery cele szczegółowe, tj. 1) zbadanie parametrów zróżnicowania genetycznego przygotowanych pod to populacji mapujących; 2) określenie zmienności podstawowych cech biometrycznych, jak wysokość roślin, rozkrzewienie, średnica pędu wiodącego jako elementów struktury plonu biomasy; 3) wygenerowanie możliwie jak największej liczby powtarzalnych markerów DNA o wysokim polimorfizmie w celu konstrukcji mapy genetycznej *Salix;* 4) identyfikacja QTL-i związanych z podstawowymi cechami plonotwórczymi biomasy.

Uważam, że cele szczegółowe pracy zostały poprawnie zredagowane, z niewielką korektą językową w przypadku celu 1), natomiast w celu głównym jest bardzo ogólne sformułowanie „stworzenie podstaw naukowych ….." . Co Doktorantka miała na myśli stosując taki ogólnik?

Przegląd piśmiennictwa liczący aż 36 stron jest zgodny z tematem przeprowadzonych badań. Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością literatury i dużą wiedzą w tym przedmiocie. Na uwagę zasługuje fakt, że rozdział ten został napisany

z wykorzystaniem, aktualnie najnowszej, dostępnej światowej literatury, tj. z ostatniego dziesięciolecia. Doktorantka zapoznała nas w ciekawy i analityczny sposób z aktualną wiedzą na temat poruszanych aspektów będących przedmiotem badań. Poruszyła ważny aspekt gospodarczy wykorzystania wielu odmian i form hodowlanych rodzaju *Salix* do celów energetycznych i farmaceutycznych. Autorka pracy zwróciła także uwagę na ogromne zróżnicowanie genetyczne w obrębie rodzaju *Salix,* które z jednej strony sprawia, że jest on ciekawym materiałem badawczym, a z drugiej strony ze względu na wyjątkową skłonność do międzygatunkowej hybrydyzacji utrudnia klasyfikację konkretnych form. Ponadto, dokonała szczegółowej charakterystyki odmian *Salix viminalis* L. i *Salix schwerinii* E.Wolf, na bazie których utworzono populacje mapujące P4 i P5, będące przedmiotem badań. Doktorantka bardzo szczegółowo opisała problematykę związaną z kierunkami selekcji i hodowli *Salix*. Wprowadziła czytelnika dogłębnie i przejrzyście w zagadnienia dotyczące wykorzystania markerów DNA w analizach molekularnych oraz w mapowaniu genetycznym rodzaju *Salix*. Ten rozdział napisany jest z ogromnym wyczuciem tematyki badawczej.

Jednakże, brakuje mi w przeglądzie piśmiennictwa, podstawowych, ale bardzo ważnych informacji, z punktu widzenia tematyki badań, zagadnień dotyczących wykorzystania techniki kultur in vitro w badaniach biologii molekularnej oraz w hodowli i selekcji *Salix*. Tym bardziej, że populacje mapujące P4 i P5 wykorzystane do badań pochodziły z kultur in vitro.

Podstawą wykonania rozprawy doktorskiej i osiągnięcia celu badawczego było wieloletnie, jednoczynnikowe doświadczenie polowe przeprowadzone w latach 2009-2017 w Stacji Dydaktyczno-Badawczej w Bałdach UWM w Olsztynie, założone w zbalansowanym układzie losowanych bloków niekompletnych. Materiałem badawczym były populacje mapujące (P4 i P5) utworzone na bazie potomstwa pochodzącego ze skrzyżowania dwóch szwedzkich odmian będących potrójnymi mieszańcami 'Tordis' – EU 9288 oraz 'Torhild' – EU 5286. Populację P4 tworzyło potomstwo powstałe ze skrzyżowania losowo wybranych form spośród potomstwa F_1: żeńskiej 'Z1/84 oraz męskiej 'Z1/13. Z kolei populację P5 tworzyło potomstwo pochodzące ze skrzyżowania wstecznego pomiędzy żeńską odmianą 'Tordis' i wybranym z pokolenia F_1 komponentem męskim 'Z1/13'. Wyprowadzenie obu populacji mapujących odbyło się w warunkach kultur in vitro. Metodykę tą przedstawiono bardzo ogólnie.

Charakterystyka warunków wyprowadzenia populacji mapujących, przebiegu doświadczenia polowego oraz opis materiału badawczego, zastosowanych metod badawczych i statystycznych Autorka przedstawiła w liczącym 14 stron rozdziale **materiał badawczy i metody.**

Układ doświadczenia polowego, zastosowane metody pomiarów biometrycznych oraz badań molekularnych generalnie nie budzą zastrzeżeń. Na szczególne podkreślenie zasługuje obszerny zakres precyzyjnie i prawidłowo wykonanych badań molekularnych, do których zostały adekwatnie dobrane metody, programy statystyczne i oprogramowania. Cennym jest wytypowanie odpowiednich starterów RAPD oraz ISSR, które posłużyły do dalszych badań molekularnych, tj. konstrukcji map genetycznych. Wykonane badania w tym zakresie zostały przeprowadzone prawidłowo.

Moje uwagi do tej części pracy dotyczą wyjaśnienia i doprecyzowania kilku kwestii:

1) nie podano terminu (lat) przeprowadzenia badań w laboratorium kultur in vitro, dotyczących wyprowadzenia pokolenia F_1 oraz populacji mapujących;
2) jak długo namnażano skiełkowane zarodki w kulturach in vitro tworząc populację klonów? (należy mieć na uwadze zmienność samoklonalną);
3) brak oznaczeń długości obiektów na fot. 1.
4) brak opisu metodyki izolacji i zapylenia oraz ile dni po zapyleniu izolowano zarodki i dlaczego? (str. 54)
5) nie znajduję informacji: z jakiego materiału i jak pobrano sztorby (25 cm odcinki). Materiał pochodzący z kultur in vitro musiał być wcześniej wysadzony do gruntu w warunkach polowych. W jaki sposób to się odbywało? Należałoby to wyjaśnić.
6) jaką powierzchnię stanowiły poletka z poszczególnymi populacjami?
7) nie podano czym i w jaki sposób dokonywano pomiarów biometrycznych, tj. wysokości i średnicy pędu wiodącego oraz plonu populacji P5. Czy plon świeżej masy dotyczy pędu wiodącego czy jest to średnia masa wszystkich pędów z jednej karpy?
8) nieprecyzyjne jest określenie terminu dokonania ww. pomiarów tj. „na koniec okresu wegetacji". Powinno podać się dokładne terminy tych pomiarów, gdyż plon biomasy zbiera się w okresie zimowym.
9) dlaczego pomiary biometryczne pędów 2 i 3-letnich u populacji P4 wykonywano w latach 2016-2017, zamiast 2013-2014, skoro założono doświadczenie w roku 2011? Natomiast u populacji P5 wykonano pomiary w latach 2012-2013, gdyż założono doświadczenie w 2010 r.
10) niepotrzebnie Doktorantka używa terminu „rozkrzewienie" w odniesieniu do liczby pędów. Rozkrzewienie rozumie się jako proces tworzenia pędów, natomiast liczba pędów jest cechą ilościową i tego określenia powinno się używać.
11) podpisy pod fotografiami 2,3 i 4 są nieprecyzyjne pod kątem terminu (powinien być podany miesiąc i rok).

Wyniki przeprowadzonych badań zostały przedstawione analitycznie w 21 stronnicowym rozdziale **'wyniki'.** Doktorantka, zgodnie z założeniami metodycznymi, prawidłowo opisała oraz zinterpretowała uzyskane wyniki pomiarów biometrycznych oraz badań genetycznych, które zamieściła w formie czytelnych tabel i rysunków. Moje zastrzeżenia budzi fakt, że niektóre tabele i rysunki są zamieszczone w aneksie, a nie w tekście rozdziału. Dużym ułatwieniem w opisie wyników badań byłoby umieszczenie wszystkich tabel i rysunków w tekście tego rozdziału, a nie umieszczać je w aneksie na końcu pracy, o cym wcześniej wspominałem. W tabelach nr 7-18, dotyczących pomiarów biometrycznych, zamieszczonych w aneksie, brakuje podania jednostek (szt., cm, mm). Powinny być one umieszczone, albo w nagłówkach (podpisach) tabel, albo w kolumnie tabeli opisującej wyniki biometryczne. Czytelniejsze byłoby też umieszczenie grup jednorodnych analizy statystycznej bezpośrednio przy wynikach badań niż w oddzielnych kolumnach. W tabeli 11. przy genotypie P4/27 są źle przypisane grupy jednorodne. Szkoda, że Doktorantka nie wykorzystała wyników analizy wariancji (grup jednorodnych) w opisie cech biometrycznych poszczególnych genotypów obu populacji mapujących. Co prawda,

uzyskała praktycznie to samo poprzez prawidłową interpretację wyników z wyliczonych rozkładów normalnych odnoszących się do tych cech.

Doktorantka prawidłowo scharakteryzowała warunki atmosferyczne na podstawie danych temperatury powietrza i opadów w latach prowadzenia doświadczenia polowego w odniesieniu do średnich wieloletnich. Drobne zastrzeżenia dotyczą kwestii używania przez Autorkę pojęcia 'warunki wilgotnościowe' na równi z 'sumą opadów' (str. 67, 89, 90). Nie jest to jednoznaczne.

Wyniki badań dotyczące analiz molekularnych, tj. opisu zróżnicowania genetycznego populacji mapujących P4 i P5, konstrukcji mapy genetycznej oraz identyfikacji QTL-i na bazie populacji P4 i na mapie populacji P5 zostały prawidłowo przedstawione w postaci poprawnie skonstruowanych tabel i rysunków. Opis wyników nie budzi zastrzeżeń, jest zwięzły i czytelny. Można jedynie znaleźć nieliczne błędy interpunkcyjne i redakcyjne. Autorka wyraźnie zaakcentowała i wskazała na te wyniki badań, które mają istotne znaczenie z punktu widzenia założonego celu badawczego.

Dyskusja uzyskanych wyników została przeprowadzona profesjonalnie i zwięźle oraz stosownie do zakresu przeprowadzonych badań. Autorka umiejętnie skonfrontowała uzyskane wyniki z doniesieniami licznych, zarówno polskich, jak i zagranicznych autorów, wykazując się bardzo obszerną wiedzą z zakresu podjętej tematyki pracy. Konfrontując własne wyniki z doniesieniami innych badaczy, Doktorantka znalazła potwierdzenie celowości wykonanych analiz oraz doboru adekwatnych metod badawczych. Jako przykład podaje, że właściwie dobrane markery RAPD i ISSR mogą być wykorzystane w analizach molekularnych umożliwiających konstrukcję map genetycznych na bazie wygenerowanych populacji mapujących.

Ta część pracy jest napisana przejrzystym i stylistycznie poprawnym językiem.

Podsumowaniem przeprowadzonych badań jest 9 poprawnie zredagowanych wniosków (chociaż bardziej można je nazwać podsumowaniem), które znajdują pełne potwierdzenie w uzyskanych wynikach badań. Są też odpowiedzią na postawiony cel główny i cele szczegółowe pracy, chociaż nie w pełnym zakresie.

Nie znalazłem we wnioskach konkretnej odpowiedzi na postawiony cel główny, tj. co tworzyło podstawy naukowe służące do zbudowania systemu selekcji wspieranego markerami molekularnymi wykorzystywanego w hodowli twórczej *Salix* spp., ze szczególnym uwzględnieniem produkcyjności roślin (co należało pod tym sformułowaniem rozumieć?

Wniosek 3. dotyczący wpływu warunków atmosferycznych na wzrost i rozwój *Salix* jest trochę zawiły i mało czytelny, nie można go w pełni odnieść do przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników.

Brakuje mi wniosku praktycznego, odpowiedzi na pytanie - czy przeprowadzone badania biometryczne i genetyczne na wygenerowanych populacjach mapujących P4 i P5 dają szansę i nadzieję na dalszą skuteczną selekcję rodzaju *Salix* w kierunku pozyskiwania coraz to bardziej wydajnych pod względem wielkości i jakości plonu biomasy, jako cennego surowca energetycznego?

Rozprawę doktorską kończy **literatura (spis)**, która została przygotowana bardzo starannie, z prawidłowo stosowanymi skrótami czasopism. Wszystkie pozycje cytowane

w pracy są odnotowane w piśmiennictwie. Również streszczenie w języku polskim i angielskim są bardzo starannie przygotowane i nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Ocena końcowa

Podniesione przez mnie wszystkie uwagi i zapytania nie pomniejszają wartości poznawczych oraz aplikacyjnych recenzowanej rozprawy doktorskiej. Bardzo dobra znajomość literatury przedmiotu, duża wiedza w zakresie omawianych zagadnień, prawidłowe przeprowadzenie obszernych i wieloletnich badań oraz poprawne wnioskowanie świadczą o dobrym naukowym przygotowaniu mgr inż. Anny Kuszewskiej. Autorka zrealizowała postawione cele badawcze oraz wniosła nowe treści poznawcze i utylitarne do stanu wiedzy w zakresie wykorzystania technik molekularnych w selekcji wydajnych genotypów z rodzaju *Salix* do celów energetycznych.

W świetle oceny formalnej i merytorycznej oraz samej treści pracy stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Anny Kuszewskiej odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zgodnie z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 18 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018, poz. 261).

W związku z powyższym stawiam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy mgr inż. Anny Kuszewskiej oraz dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego i ubiegania się o stopień doktora nauk rolniczych w powyższej dyscyplinie.

dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. nadzw.