

prof. dr hab. inż. Rafał Barański  
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie  
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

## Recenzja rozprawy doktorskiej

pt.:

### **„Analiza zmienności i identyfikacja QTL dla wybranych cech owoców dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* Duchesne)”**

autor rozprawy:

**mgr inż. Karolina Kaźmińska**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl trzech artykułów naukowych opatrzonych wspólnym opracowaniem. Artykuły zostały opublikowane w międzynarodowych czasopismach naukowych o uznanej renomie i charakteryzujących się znaczącymi wskaźnikami bibliometrycznymi tj: *Scientia Horticulturae* (IF: 1,961; 35 pkt. MNiSW za rok 2017), *Molecular Breeding* (IF: 2,227; 40 pkt. MNiSW za rok 2018) i *Genes* (IF: 3,759; 100 pkt. MNiSW za rok 2020). Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich artykułach, a jej wkład w ich powstanie był dominujący i merytorycznie istotny. Doktorantka uczestniczyła w opracowywaniu koncepcji badań, realizowała część eksperymentalną przygotowując materiał badawczy i zakładając doświadczenia, wykonywała analizy fenotypowania i molekularne genotypowania SSR, opracowywała dane i interpretowała wyniki SSR i DARtseq, konstruowała mapy genetyczne i identyfikowała QTL, przygotowywała manuskrypty publikacji. Dołączone oświadczenia pozostałych współautorów o ich wkładzie w powstanie tych publikacji są zgodne z oświadczeniami Doktorantki. Rozprawa obejmuje oprócz artykułów, streszczenie w j. polskim i angielskim, spis treści i wykaz artykułów stanowiących cykl, przegląd literatury stanowiący wprowadzenie do prowadzonych badań, cel badań i hipotezy badawcze, rozdział poświęcony wykorzystanym materiałom i metodom oraz omówienie wyników i ich dyskusję. Całość zamyka dziewięć wniosków podsumowujących badania i spis wykorzystanej literatury. Opracowanie to jest podsumowaniem treści zawartych w cyklu trzech artykułów. Badania będące przedmiotem rozprawy były finansowane w ramach programów MRiRW oraz MNiSW i zostały wykonane w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin aktualnie Instytutu Biologii SGGW, a promotorem był prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski.

Autorka rozprawy przedstawiła dostępną wiedzę związaną z postawionym problemem badawczym w rozdziale zatytułowanym Przegląd literatury, w którym wyodrębniła trzy podrozdziały. W pierwszym przybliżyła pochodzenie dyni olbrzymiej i opisuje jej biologię, a także cechy morfologiczne i cechy jakościowe owoców zwracając uwagę na dostępną zmienność form występujących w różnych rejonach świata. Zwraca uwagę na badania zmienności genetycznej gatunku prowadzone do tej pory, zwłaszcza tych z wykorzystaniem systemów markerowych. Badania molekularne kolekcji zasobów genowych dyni olbrzymiej były do tej pory jedynie fragmentaryczne tj. oparte o niewielką liczbę obiektów lub



ukierunkowane na odmiany o niewielkim obszarze występowania. Prezentowana wiedza jednoznacznie wskazuje na brak poszerzonych badań, które dałyby bardziej kompleksowy obraz zmienności genetycznej gatunku.

Drugi rozdział dotyczy znaczenia gospodarczego i cech użytkowych dyni olbrzymiej. Doktorantka przedstawia istotną rolę gatunku w uprawie na świecie i w Polsce wskazując m.in. na coraz większe zainteresowanie tą rośliną warzywną. Zainteresowanie to wynika zarówno z walorów dietetycznych, bowiem dynia może zawierać bardzo duże ilości karotenoidów, w tym prowitaminy A, cukrów, które po zbiorze w trakcie okresu przechowywania ulegają przemianie ze skrobi do sacharozy, jak i z uwagi na walory estetyczne, bowiem gatunek ten wytwarza owoce o różnej barwie, wielkości i kształcie. Stąd wynika potrzeba tworzenia nowych odmian, zarówno tych o podwyższonej jakości owoców jak i odmian spełniających określone wymagania konsumentów, a ponadto tolerancyjne na choroby czy niedobór wody w trakcie wegetacji. Doktorantka wskazuje także główne metody hodowli odmian dyni zwracając uwagę na zjawisko heterozji i możliwość zwiększenia plonu poprzez tworzenie odmian o pokroju krzaczastym i wytwarzających więcej kwiatów żeńskich.

Trzeci podrozdział poświęcony został czynnikom genetycznym determinującym wybrane cechy oraz mapom genetycznym. Liczba opisanych genów dyni olbrzymiej jest krótka, co znacznie ogranicza możliwości tworzenia nowych odmian w oparciu o dogłębną wiedzę w zakresie dziedziczenia cech. Do tej pory opublikowano tylko jeden zsekwencjonowany genom dyni olbrzymiej i dostępnych jest kilka transkryptomów ukierunkowanych na różnice w biologii rozwoju i kwitnienia. Natomiast powstało kilka map genetycznych, które Doktorantka pokrótce charakteryzuje i wskazuje ich mocne i słabe strony. Te drugie przeważają, bowiem większość z nich jest słabo wysycona markerami. Tylko jedna mapa ma duże zagęszczenie markerów o średnim dystansie ok. 0,5 cM i ponadto zlokalizowano na niej 10 QTL związanych z cechami nasion. Tym samym prowadzenie badań zmierzających do opracowania nowych map i umiejscowienia na nich genów cech użytkowych jest wysoce zasadne.

Rozdział Przegląd literatury jest napisany zwięźle i rzeczowo dając dobre rozeznanie w zakresie przedstawianej problematyki. Jest oparty o liczną światową literaturę głównie anglojęzyczną opublikowaną w uznanych czasopismach naukowych. Bezspornie wynika z niego, że Doktorantka jest dobrze zorientowana o stanie aktualnej wiedzy w zakresie poruszanej tematyki. Cały rozdział uzasadnia postawione dalej cele badań Doktorantki, a mianowicie są nimi: 1) ocena zmienności genetycznej kolekcji dyni olbrzymiej, 2) skonstruowanie mapy genetycznej oraz 3) zidentyfikowanie loci cech ilościowych (QTL) powiązanych z wybranymi cechami owoców. Cele te są istotne dla dalszego poszerzania wiedzy dotyczącej gatunku, a ich realizacja może przyczynić się do postępu zarówno w dalszych badaniach podstawowych jak i dać istotne narzędzia przydatne w tworzeniu nowych odmian.

Rozdział Materiał i metody opisuje w skrócie materiał badawczy wykorzystywany w badaniach i stosowane metody, przy czym dotyczy on łącznie wszystkich badań opisanych w dołączonym cyklu trzech artykułów. Do oceny zmienności genetycznej Doktorantka wykorzystywała kolekcję 85 odmian i linii o różnym pochodzeniu i reprezentujących różne typy. Jest to unikalna kolekcja o bardzo dużej zmienności form utworzona dzięki donacji obiektów przez banki genów i instytucje z różnych stron świata. Ponadto, Doktorantka wykorzystywała wyprowadzone w SGGW dwie linie wsobne o odmiennych cechach (nr 801



i 802), które stanowiły formy rodzicielskie do uzyskania populacji 92 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) o wysokim stopniu wsobności (pokolenie F6). Co prawda w opisie Doktorantka błędnie oznaczyła obie linie tym samym numerem (802) ale chciałbym podkreślić, że jest to jedyny błąd edytorski jaki dostrzegłem w całej pracy, co świadczy o niezwykle dużej staranności w przygotowaniu rozprawy.

Część opisująca metodykę jest moim zdaniem nieco zbyt skrótowa i dopiero lektura odpowiednich rozdziałów w dołączonych artykułach pozwala w pełni zrozumieć układ doświadczalny i pewne stosowane metody, np. zabrakło w mojej ocenie opisu metody detekcji markerów SSR czy metody wyznaczania dystansu genetycznego, a analiza PCA została błędnie określona jako metoda określenia dystansu genetycznego zamiast wizualizacji tego dystansu. Również zabrakło mi bardziej dokładnego opisu co było przedmiotem badań mikroskopowych. Niemniej jednak, cały rozdział pozwala wstępnie zapoznać się ze stosowanymi metodami w sposób wystarczający dla zrozumienia co było wykorzystywanym materiałem, a także przebiegiem doświadczeń i wykonanych analiz.

Kolejna część rozprawy poświęcona jest omówieniu wyników zawartych w dołączonych artykułach i ich dyskusji. Pierwszy artykuł poświęcony został ocenie zmienności genetycznej kolekcji 85 odmian i linii dyni olbrzymiej i jednej odmiany dyni zwyczajnej jako obiektu bardziej odległego genetycznie i służącego do ukorzenia dendrogramu obrazującego grupowanie obiektów w kolekcji. Doktorantka wykorzystowała 23 pary starterów SSR wytypowane na podstawie wstępnej analizy dostępnego publicznie zestawu 500 markerów opublikowanych przez Gong i wsp. (2008). Nie jest dla mnie jasne, czy wstępne testowanie tego zestawu 500 markerów także wykonała Doktorantka, ale nawet jeżeli nie to uzyskanie wyników przy detekcji w poliakrylamidzie dla całej kolekcji 86 obiektów musiało wiązać się z bardzo dużym nakładem pracy. Zidentyfikowane zostało łącznie 99 alleli SSR, od 3 do 10 dla poszczególnych markerów, o różnym stopniu heterozygotyczności i zdolności dyskryminacyjnej, przy czym ten drugi parametr był stosunkowo wysoki (średnio 0,51), dzięki czemu grupowanie obiektów przy użyciu niewielkiej liczby markerów mogło zostać uznane za wiarygodne. Wykryte polimorfizmy SSR zostały użyte do wyliczenia dystansu genetycznego i wizualizowania zróżnicowania genetycznego poprzez skonstruowanie dendrogramu metodą najbliższego sąsiada (Neighbor-Joining), wykonanie obrazowania zmienności w analizie składowych głównych, a także do klasyfikacji głównych pul genowych metodą bayesowską. Tu znowu Doktorantka błędnie opisała w opracowaniu że metodą NJ wykonano analizę dystansu genetycznego, chociaż w artykule informacje są podane poprawnie. Uzyskane wyniki dostarczają nowej wiedzy o zmienności kolekcji i różnicach genetycznych, które co prawda w większości były zgodne z przyjętym podziałem na typy odmian, ale już nie koniecznie pokrywały się z podziałem według morfologii owoców oraz, co ciekawsze z pochodzeniem geograficznym. W tym świetle słuszne wydają się formułowane konkluzje tłumaczące te rozbieżności intensywną wymianą materiałów pomiędzy ośrodkami hodowli odmian. Prosiłbym jednak Doktorantkę o komentarz w trakcie publicznej obrony pracy, czy zastosowany przez nią system detekcji markerów SSR można uznać za w pełni wiarygodny i czy zatem użycie innych metod detekcji nie prowadziłyby do uzyskania nieco odmiennych wyników, zwracając uwagę chociażby na wykryte polimorfizmy alleliczne w obiektach pochodzących z różnych źródeł, a reprezentujących tą samą odmianę. Szkoda także, że analiza wyników nie została poprowadzona nieco dalej tak aby scharakteryzować nie markery, a badane obiekty, np. poprzez określenie współczynnika heterozygotyczności obiektów lub wskazanie alleli



unikalnych (private allele) – chyba, że takich nie było, co z punktu widzenia celu badań wydaje się zasadne.

Drugi artykuł z cyklu dotyczy opracowania mapy genetycznej w oparciu o markery SSR i DArTseq. Doktorantka wykorzystywała 92 linie RIL pokolenia  $F_6$  i blisko 2000 markerów, które pozwoliły na zaproponowanie mapy obejmującej 20 grup sprzężeniowych odpowiadających liczbie chromosomów dyni olbrzymiej. W odróżnieniu od istniejących map tego gatunku szczególnie wartościowe było wykorzystanie ustabilizowanych populacji RIL, co wpływa na wiarygodność opracowania. Zaletą stworzonej mapy jest jej duże i stosunkowo równomierne wysycenie markerami, a pod względem parametrów tylko nieznacznie odbiega od równoległe opracowanej mapy przez zespół Wang i wsp. (2020). Samo stworzenie mapy genetycznej nie byłoby znaczącym osiągnięciem gdyby nie powiązanie jej z wyznaczeniem lokalizacji określonych genów lub determinant cech ilościowych (QTL). Doktorantka wykonując ocenę morfologiczną owoców oraz ich składu chemicznego pozyskała dodatkowe dane pozwalające dokonać zaawansowanej analizy prowadzącej w efekcie do umiejscowienia odpowiedzialnych za te cechy genów na mapie. Co więcej, dwukrotne wykonanie doświadczenia polowego i niezależna analiza pozyskanych danych sprawia, że uzyskane wyniki można uznać za wysoce wiarygodne. Doktorantka wykazała wpieryw zróżnicowanie populacji RIL pod względem cech plonotwórczych, jakości owoców i zawartości w nich karotenoidów (zidentyfikowała sześć związków) oraz sacharozy. Wyniki te zawarte zostały w drugiej i trzeciej publikacji z prezentowanego cyklu. Zidentyfikowanych zostało 13 QTL związanych z zawartością barwników i 3 QTL związane z barwą, przy czym obie te grupy kolokalizowały ze sobą, a występowały na chromosomie 2, 4 i 14. Również na chromosomie 14 zlokalizowany został gen *ov* odpowiedzialny za barwę zawiązka owoców. Osiągnięcie to uważam za wartościowe i o dużym znaczeniu. Niemniej jednak uważam, że Doktorantka przy okazji lokalizacji QTL niepotrzebnie dywaguje o ich znaczeniu stwierdzając, że pomiar barwy miąższu i analiza jej parametrów może ułatwić proces hodowli odmian o podwyższonej zawartości karotenoidów. Po pierwsze, do takiej pracy nie potrzebna jest wiedza o QTL, ani o budowie mapy genetycznej, a po drugie, w takim podejściu nie dostrzegam znamion nowości. Doktorantka zidentyfikowała ponadto 26 QTL dla cech związanych z budową i wielkością owoców oraz wskazała ich lokalizację na ośmiu chromosomach. Co szczególnie wydaje się interesujące, to fakt, że szereg z tych QTL zlokalizowanych jest na tym samym końcu chromosomu 4 co w/w QTL związanych z zawartością karotenoidów i barwą owoców. Także inne QTL występowały na chromosomie 2 i 14, tych samych co QTL zawartości karotenoidów. Wyniki te sugerują wspólną lokalizację genów cech związanych z udomowieniem dyni olbrzymiej i ograniczona do trzech stosunkowo niewielkich regionów genomu na trzech chromosomach. Dalsze analizy w oparciu o genom referencyjny naprowadziły Doktorantkę do wskazania szeregu potencjalnych genów i czynników transkrypcyjnych mogących mieć wpływ na ekspresję badanych cech użytkowych, a których występowanie potwierdzono w badaniach innych gatunków, nie tylko dyni.

Konkludując pragnę zauważyć, że dotychczasowe badania genetyczne i genomiczne u dyni olbrzymiej są ograniczone, co między innymi wynika z faktu allotetraploidalnego genomu oraz bardzo długiej historii udomowienia prowadzącej do powstania zróżnicowanych form, a gatunek ten uważany jest za jeden z najbardziej zróżnicowanych w rodzaju *Cucurbita*. Dlatego podjęcie się badań i uzyskanie satysfakcjonujących wyników jest dużym osiągnięciem. Doświadczenia zostały poprawnie zaplanowane, a dobór materiałów i metod pozwolił w pełni zrealizować cele badań i zweryfikować stawiane hipotezy. Wyniki



zostały poprawnie opracowane, zaprezentowane, omówione i zinterpretowane. Cała rozprawa stanowi opracowanie opisujące oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. O znaczeniu osiągnięcia świadczy także fakt przyjęcia omawianych artykułów do publikacji przez uznane czasopisma naukowe oraz, że pierwszy artykuł z 2017 roku był już 12 razy cytowany przez innych badaczy.

W trakcie lektury rozprawy nasunęły mi się pytania, na które prosiłbym Doktorantkę o ustosunkowanie się w trakcie publicznej obrony:

1. Jakie inne metody detekcji alleli SSR możnaby zaproponować dla podniesienia wiarygodności wyników?
2. Czym można wytłumaczyć wykazaną większą korelację zawartości  $\alpha$ -karotenu niż  $\beta$ -karotenu z zawartością związków cyklu ksantofilowego, chociaż związki te powstają w wyniku metabolizmu  $\beta$ -karotenu, a nie  $\alpha$ -karotenu?
3. Czy lokalizacja QTL wielu cech użytkowych na końcu chromosomu jest zjawiskiem powszechnym oraz czy fakt lokalizacji na najdłuższym chromosomie (Ch4) ma szczególne znaczenie w kontekście procesu udomowienia?

### **Podsumowanie**

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Całość badań jest logicznie zaplanowana i zrealizowana z użyciem właściwych metod w celu uzyskania zakładanych celów, a wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawiona rozprawa wskazuje także, że mgr inż. Karolina Kaźmińska wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie przedstawionej tematyki badawczej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując, uważam że praca spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669) i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 5.01.2021

prof. dr hab. Rafał Barański



