

dr hab. inż. Stefan Stojalowski, prof. ZUT
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
ul. Słowackiego 17
71-434 Szczecin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Karoliny M. Kaźmińskiej** pt.
**„Analiza zmienności i identyfikacja QTL dla wybranych cech owoców dyni olbrzymiej
(*Cucurbita maxima* Duchesne)”**

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Karoliny Kaźmińskiej zawiera cykl trzech publikacji, które ukazały się w latach 2017-2020. Wszystkie trzy prace opublikowano w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, których wartości współczynnika Impact Factor (IF) w latach wydania prac mieściły się w granicach od 1,76 do 3,759. Sumaryczny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 7,381, a suma cytowań w bazie Web of Science na koniec roku 2020 wynosiła 14. Wszystkie trzy prace miały charakter wieloautorski, ale w każdej z nich doktorantka była pierwszą autorką i odegrała dominującą rolę przy opracowywaniu koncepcji badań, ich realizacji, opracowaniu wyników i ich ostatecznej interpretacji. Procentowy wkład mgr Kaźmińskiej w przygotowanie każdej z publikacji wynosił od 52 do 60% i został potwierdzony stosownymi oświadczeniami złożonymi przez wszystkich współautorów.

Tematyka badań podjęta przez mgr Karolinę Kaźmińską dotyczyła oceny zmienności genetycznej w obrębie kolekcji odmian i linii dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima* Duchesne) oraz wykorzystania map genetycznych do zlokalizowania *loci* kontrolujących wybrane cechy ilościowe (ang. *Quantitative Trait Loci* – QTL). Dynia olbrzymia jest jednym z trzech gatunków rodzaju *Cucurbita*, które mają znaczący udział w produkcji warzywnej na świecie (pozostałe to dynia zwyczajna i piżmowa). Dynie należą do najstarszych roślin uprawnych Nowego Świata. Kolebką dyni olbrzymiej jest Ameryka Południowa, gdzie została udomowiona około 4000 lat temu. Wkrótce po odkryciu dokonany przez Krzysztofa Kolumba dynie trafiły do Europy, a potem innych części globu. Ich zróżnicowanie genetyczne i związane z tym duże zdolności dostosowawcze spowodowały, że są aktualnie uprawiane niemal na całym świecie. W Polsce dynie są po ogórku najważniejszym

ekonomicznie warzywem z rodziny *Cucurbitaceae*. Badania podjęte przez mgr Kaźmińską mają więc nie tylko walor czysto poznawczy, ale są też ważne dla produkcji ogrodniczej. Realizacja przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie ogrodnictwo (aktualnie klasyfikowanej jako „rolnictwo i ogrodnictwo”) w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie jest w pełni uzasadniona tematyką badań.

Tytuł pracy doktorskiej został sformułowany poprawnie. Nie jest przesadnie szczegółowy, ale doskonale informuje czytelnika o tematyce wykonanych badań. Cykl publikacji stanowiący rdzeń pracy doktorskiej został poprzedzony liczącym 29 stron opisem uzupełniającym rozprawę. W opisie znalazły się streszczenia w języku polskim i angielskim (wraz ze słowami kluczowymi), Przegląd literatury, Cel badań i hipotezy badawcze, opis Materiału i metod, syntetyczne Omówienie wyników i dyskusja, Wnioski oraz Spis literatury. Lektura tego opisu pozwala na łatwe zrozumienie spójnego charakteru badań opublikowanych w niezależnych artykułach naukowych wydanych przez różnych wydawców kierujących się odmiennymi standardami edytorskimi.

Ze względu na moją specjalność zawodową, którą są zboża, z ogromnym zainteresowaniem zapoznałem się z Przeglądem literatury opracowanym przez doktorantkę. Autorka w sposób syntetyczny, a jednocześnie przekrojowy scharakteryzowała gatunek, który był przedmiotem jej badań. Ten tekst czyta się z przyjemnością, jest napisany ładnym językiem i zawiera wiele ciekawych informacji o dyniach, począwszy od informacji historycznych, poprzez aktualne znaczenie ekonomiczne kończąc na najnowszych wynikach badań fizjologicznych i genetycznych. Jest to opis dużo pełniejszy i bardziej kompleksowy niż treści znajdujące się w załączonych publikacjach, które zgodnie z wymogami czasopism musiały być ograniczane do najważniejszych zagadnień. Doceniając wkład pracy autorki w napisanie tego rozdziału, pozwolę sobie na wskazanie pewnych sformułowań, które moim zdaniem należałoby skorygować:

- Str. 2, zdanie: „Dynia olbrzymia trafiła do Europy w pierwszej połowie XVI wieku, skąd rozprzestrzeniła się na inne kontynenty (Decker-Walters i Walters 2000, Paris 2016) między innymi w Azji, która jest uznawana za wtórne centrum pochodzenia *C. maxima* (Esquinas-Alcazar i Gulick 1983).” – moim zdaniem lepiej byłoby napisać „wtórne centrum różnicowania genetycznego”

- Str. 5, zdanie: „Plon owoców można zwiększyć poprzez wykorzystanie form krzaczastych, co umożliwi zwiększenie liczby roślin na jednostce powierzchni...” – chyba chodziło raczej o „zwiększenie liczby owoców na jednostce powierzchni” ?

- Str. 9, ostatnie zdanie: „... gen zlokalizowany na dolnym ramieniu chromosomu 4...” – na mapach genetycznych krótkie ramiona chromosomów umieszczamy zwyczajowo u góry, a długie na dole, ale w nomenklaturze genetycznej nie stosujemy określeń „ramię górne lub dolne”. To samo błędne sformułowanie pojawia się też w polskim streszczeniu, chociaż w wersji anglojęzycznej jest już poprawnie (long arm), podobnie jak w załączonych publikacjach.

Cel badań został sformułowany w pełni poprawnie – dobrze charakteryzuje cele przyświecające wszystkim trzem publikacjom zawartym w rozprawie i potwierdza ich spójny charakter. Uzupełnieniem celu badań są Hipotezy badawcze. Osobiście nie jestem zwolennikiem obligatoryjnego definiowania hipotez badawczych, szczególnie wtedy gdy wynikają one w sposób oczywisty z celu badań. Takie hipotezy często brzmią sztucznie i niczego istotnego nie wnoszą. Tutaj muszę przyznać, że hipotezy zostały sformułowane przez doktorantkę tak, że stanowią doskonałe uzupełnienie bardzo syntetycznie zredagowanego celu badań i są jak najbardziej na swoim miejscu.

W opisie Materiału i metod wprowadzającym do cyklu publikacji znalazł się oczywisty błąd na str. 11: linia wyprowadzona ze wschodnioeuropejskiej odmiany lokalnej została opisana jako linia 802, zamiast 801 (co wynika jasno z treści załączonych publikacji). Na tej samej stronie, w kolejnym punkcie, pojawia się sformułowanie „... 92 rekombinowanych linii wsobnych...”, które już na str. 16 zostały nazwane „rekombinacyjnymi liniami wsobnymi”. Ta nieścisłość (brak konsekwencji autorki) odśłania często spotykany w nomenklaturze genetycznej problem: polski słownik genetyczny wciąż powstaje *de novo*. Używana przez mgr Kaźmińską populacja mapująca to populacja RIL – Recombinant Inbred Lines, która w j. angielskim jest od lat jednoznacznie zdefiniowana. Określenie anglojęzyczne „recombinant” można tłumaczyć na polski jako „rekombinowane” lub „rekombinacyjne” (a spotkałem się też z określeniem „rekombinantowe”). Nie mogę więc autorce wytknąć innego błędu poza brakiem konsekwencji. Użyta przez nią forma „rekombinowane” na str. 11 znajduje uzasadnienie np. w podręczniku „Hodowla roślin z elementami biotechnologii” (red. B. Michalik, L. Spiss, wyd. PWRiL), a „rekombinacyjne” ze str. 16 jest zgodne z „Biotechnologią roślin” (red. S. Malepszy, wyd. PWN). Osobiście skłaniałbym się ku tej drugiej formie, gdyż pierwsza może sugerować, że rekombinacja była tu w jakiś sposób indukowana przez człowieka, a w materiale badanym przez doktorantkę był to proces w pełni naturalny. Nie da się ukryć, że polskojęzyczna nomenklatura genetyczna wymaga usystematyzowania.

W kolejnym rozdziale mgr Kaźmińska opisała syntetycznie wyniki badań zawarte w cyklu publikacji.

Pierwsza z prac została opublikowana w *Scientia Horticulturae* (no 219: 37-44) i dotyczyła oceny zmienności genetycznej w obrębie kolekcji odmian i linii hodowlanych dyni olbrzymiej. Kolekcja liczyła 85 genotypów o zróżnicowanym pochodzeniu geograficznym – badane formy pochodziły z Europy, Ameryki Północnej, Azji, Australii i Nowej Zelandii. Reprezentowane były różne typy ogrodnicze wyróżnione na podstawie cech morfologicznych. Do badanych obiektów dołączono jedną linię reprezentującą odmienny gatunek: dynię zwyczajną (*Cucurbita pepo*). W badaniach wykorzystano specjalnie wyselekcjonowany zestaw wysoce polimorficznych markerów SSR. Wyniki analizowano statystycznie z wykorzystaniem zróżnicowanych metod.

Wybrana technika markerowa okazała się bardzo efektywna. Wyraźnie widoczna była odrębność genetyczna dyni zwyczajnej od wszystkich badanych form dyni olbrzymiej. W zależności od użytej metody statystycznej wyróżniono 3 grupy genotypów (analiza głównych koordynat PCoA) lub dwie grupy, z których jedna zawierała dwie podgrupy (analizy Neighbor-joining oraz Structure). Trzy typy ogrodnicze (Banana, Buttercup/Kabocha oraz Hubbard) zostały zaliczone do pierwszej grupy genotypów – pomimo odrębności morfologicznej nie różniły się znacząco na poziomie genetycznym. Wynik ten nie musi zaskakiwać – nieraz drobne zmiany w genomie wywołują szerokie zmiany na poziomie fenotypowym (szczególnie, gdy geny reprezentowane przez różne warianty wykazują działanie plejotropowe). Odmiany lokalne z Europy Wschodniej stanowiły oddzielną podgrupę, a formy o dużych owocach i formy typu Mammoth zostały zaliczone do kolejnego podzbioru. Wyniki analizy zróżnicowania genetycznego nie wykazywały związku z pochodzeniem geograficznym badanych form dyni.

Przedmiotem drugiej publikacji cyklu była identyfikacja *loci* cech ilościowych kontrolujących barwę zawiązków oraz zawartość karotenoidów w owocach. Praca ukazała się w czasopiśmie *Molecular Breeding* (no 38(9): 114). W ramach badań wytworzona została populacja mapująca składająca się z 92 rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pokolenia F₆. Z każdej RIL oraz z linii rodzicielskich 801 i 802 wyizolowano DNA w celu wykonania analiz z użyciem markerów molekularnych. Głównym źródłem markerów była metoda genotypowania poprzez sekwencjonowanie (ang. *Genotyping by Sequencing* – GBS). Wykorzystano komercyjny wariant tej metody o nazwie DArTseq oferowany jako usługa przez firmę Diversity Arrays Technology Pty Ltd. (Bruce, Australia). Analizy DArTseq dostarczają danych o dwóch typach markerów: SNP (markery o charakterze kodominującym)

oraz Silico-DArT (markery dominujące, niepozwalające na identyfikację heterozygot). Dane genotypowe zostały uzupełnione o zestaw 36 markerów SSR. Ogółem do tworzenia mapy genetycznej genomu dyni olbrzymiej użyto 1824 markery (36 SSR, 1094 SNP i 694 Silico-DArT). Utworzona mapa obejmowała wszystkie 20 chromosomów dyni, jej łączna długość przekracza 2200 cM, a średni dystans między markerami to 1,21 cM. W chwili opublikowania była to pierwsza mapa genetyczna dyni olbrzymiej skonstruowana na populacji RIL (wcześniejsze mapy były oparte o populacje F2 i nie miały dużej przydatności do lokalizowania QTLi).

Na skonstruowanej mapie genetycznej wykonano mapowania interwałowe w celu zlokalizowania genów związanych z barwą owoców i zawartością karotenoidów. Zidentyfikowano trzy skupiska QTLi związanych z badanymi parametrami: na długich ramionach chromosomów 2, 4 i 14. W syntetycznym Omówieniu wyników na str. 18 znajduje się zdanie dotyczące tej części wyników: „Kolokalizacja QTL związanych z zawartością karotenoidów może być uzależniona od występowania istotnych pozytywnych korelacji pomiędzy zawartością poszczególnych związków.” Jest to według mnie sformułowanie niezbyt trafne – opisana tu zależność jest dokładnie odwrotna: to korelacje między badanymi cechami wynikają prawdopodobnie z plejotropowego charakteru genów zlokalizowanych w tych obszarach – te same geny wpływają na kilka badanych parametrów jednocześnie. Analiza bioinformatyczna sekwencji DNA z obszarów QTLi oraz badania mikroskopowe pozwoliły na sformułowanie pewnych hipotez dotyczących możliwych genów kandydackich.

Bezpośrednią kontynuacją badań opisanych w drugiej publikacji są wyniki, które znalazły się w ostatniej pracy z cyklu. Została ona opublikowana w czasopiśmie naukowym wydawnictwa MDPI: Genes (2020, 11: 419). Mapę genetyczną opisaną wcześniej użyto do identyfikacji QTLi związanych z plonem i parametrami morfologicznymi owoców dyni olbrzymiej. Dane niezbędne do wykonania mapowania interwałowego zgromadzono w czasie doświadczeń polowych prowadzonych w jednej lokalizacji w dwóch sezonach wegetacyjnych (Stacja Doświadczalna SGGW „Wolica”, lata 2013 i 2014). Badano cechy o dużym znaczeniu dla praktyki: wczesność, masa owocu, liczba owoców na roślinie, plon owoców z rośliny, parametry charakteryzujące kształt owoców, zawartość suchej masy i sacharozy. *Loci* cech ilościowych wykryto na ośmiu chromosomach. Wśród nich ponownie pojawiły się skupiska QTLi na długich ramionach chromosomów 2, 14, a przede wszystkim na chromosomie 4.

Wnioski wynikające z badań opisanych w cyklu publikacji zostały przez mgr Kaźmińską zebrane w formie 9 punktów na stronach 21 i 22 rozprawy. Zostały one zredagowane starannie, sformułowania są informatywne, a jednocześnie świadczą o krytycznym podejściu

doktorantki do uzyskanych wyników. Osobiście za najbardziej dyskusyjny uważam wniosek nr 9 (mam nadzieję na wymianę poglądów z doktorantką przy okazji publicznej obrony). Zgadzam się oczywiście z sugestią, że długie ramię chromosomu 4 zawiera bardzo ważne z praktycznego punktu widzenia geny, ale ich identyfikacja została oparta o badania populacji dwu-rodzicielskiej. Jednym z komponentów rodzicielskich populacji mapującej była wschodnioeuropejska odmiana lokalna. Zastanawiam się, czy sugerowane zagęszczanie mapy i próby klonowania genów nie powinny zostać poprzedzone weryfikacją, na ile ten obszar genomu jest istotny dla hodowców korzystających z bardziej zaawansowanych materiałów wyjściowych.

Podsumowując, pragnę podkreślić że wszystkie moje uwagi krytyczne dotyczące rozprawy pani mgr Karoliny Kaźmińskiej miały charakter dyskusyjny i dotyczyły głównie kwestii językowo-edycyjnych. Nie budzi moich wątpliwości fakt, że zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójnym tematycznie zbiorem opublikowanych artykułów naukowych, w których tworzeniu doktorantka miała dominujący udział. Postawione w pracy doktorskiej cele zostały osiągnięte i rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Ranga czasopism i dotychczas zarejestrowane w bazie *Web of Science* cytowania artykułów potwierdzają moje osobiste odczucie, że opisane w rozprawie badania stanowią istotny wkład w rozwój nauk rolniczych. Tym samym, w mojej ocenie, praca mgr Karoliny Kaźmińskiej w zupełności spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Dlatego wnioskuję do stosownych organów statutowych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego o dopuszczenie mgr Karoliny Kaźmińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stefan

Szczecin, 6.01.2021.

dr hab. inż. Stefan Stojałowski