



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii

dr hab. inż. Ewa Grzebelus
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Kraków, 26 maja 2017

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Smydy-Dajmund

pt. Charakterystyka somatycznych mieszańców *Solanum x michoacanum* (+) *S. tuberosum* i autofuzantów 4x *S. x michoacanum* oraz wykorzystanie ich do rozszerzenia puli hodowlanej ziemniaka uprawnego *S. tuberosum* L.

OPIS FORMALNY ROZPRAWY

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Smydy-Dajmund została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Jadwigi Śliwki, prof. nadzw. IHAR-PIB w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, oddział w Młochowie. Zasadniczą część dysertacji stanowią trzy spójne tematycznie artykuły naukowe w języku angielskim, opublikowane w latach 2013-2017 w międzynarodowych czasopismach naukowych o uznanej renomie w dziedzinie nauk o roślinach, znajdujących się w bazie *Journal Citation Report (JCR): Plant Cell Reports* (2x) i *American Journal of Potato Research*. Sumaryczny pięcioletni współczynnik wpływu tych czasopism (tzw. *impact factor*) wynosi 7,58, co odpowiada 95 punktom MNiSW (wg. wykazu czasopism, część A). Wszystkie prace są wieloautorskie, mają od 5 do 8 autorów, a mgr Paulina Smyda-Dajmund jest pierwszym autorem każdej pracy. Włączone do dokumentacji oświadczenia współautorów publikacji wskazują na indywidualny wkład Doktorantki przy opracowywaniu koncepcji badań, prowadzeniu części eksperymentalnej badań, opracowaniu i interpretacji wyników oraz znaczący Jej udział w przygotowaniu i korekcie manuskryptów. Dodatkowo, potwierdzeniem dominującego wkładu Doktorantki w powstanie każdej z trzech publikacji stanowiących recenzowaną rozprawę jest pełnienie roli autora korespondencyjnego. Zestawienie powyższych prac w rozprawę doktorską nie budzi zastrzeżeń, tworzą one bowiem monotematyczny cykl publikacji dotyczący otrzymywania i wielopłaszczyznowej charakterystyki mieszańców somatycznych *Solanum x michoacanum* (+) *S. tuberosum* oraz

autofuzantów 4x *S. x michoacanum*. Układ rozprawy jest klasyczny, otwiera ją *Streszczenie w j. polskim i angielskim*, po czym następują rozdziały zatytułowane: *Przegląd literatury*, *Cel badań*, *Materiał i metody*, *Omówienie wyników*, *Podsumowanie uzyskanych wyników*, *Obserwacje i wnioski*. Całość zamyka *Spis literatury*, oraz dodatkowo pełne teksty publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Przedstawiona praca napisana jest w sposób jasny i przejrzysty, a poszczególne jej rozdziały zawierają tylko istotne informacje, czytelnie wprowadzając w tematykę prowadzonych badań zarówno od strony teoretycznej i eksperymentalnej. Należy także podkreślić, że praca została starannie zredagowana – znalazłam tylko kilka błędów literowych.

MERYTORYCZNA OCENA ROZPRAWY

Somatyczna hybrydyzacja to technika pozwalająca na przekroczenie barier krzyżowalności pomiędzy odległymi taksonomicznie gatunkami, co sprawia, że jest ona szczególnie interesująca z aplikacyjnego punktu widzenia, w kontekście poszerzenia zmienności roślin uprawnych i poprawy ich cech agronomicznych. Jej zastosowanie w praktyce hodowlanej jest jednak stosunkowo trudne, gdyż właściwie dla każdego gatunku wiąże się z detalicznym opracowaniem protokołów izolacji protoplastów, ich fuzji, regeneracji produktów fuzji, selekcji i weryfikacji form mieszańcowych oraz ich oceny fenotypowej, a podjęte działania na każdym etapie obarczone są dużą niepewnością uzyskania założonych celów. Mimo tych trudności, somatyczna hybrydyzacja jawi się jako atrakcyjna technika przyspieszenia postępu hodowlanego w stosunku do tego, jaki jest osiąganym metodami konwencjonalnymi, a prowadzenie badań w tym zakresie jest pożądane i wpisuje się w nurt aplikacji biotechnologii w hodowli roślin.

Taki właśnie trudny temat podjęła Pani Paulina Smyda-Dajmund w swej pracy doktorskiej, postawiła sobie jasny cel i systematycznie go realizowała. Przedstawione badania zostały starannie zaplanowane i wykonane, a uzyskane wyniki celnie zinterpretowane. Wnoszą one nową wiedzę na temat introgresji pożądanych cech z form dzikich do uprawnych na drodze somatycznej hybrydyzacji, szczególnie w kontekście wykorzystania tej metody w praktyce hodowlanej. Dobór materiału badań, jak i zastosowanych metod badawczych, jest kompleksowy i nie budzi moich zastrzeżeń. Najważniejszymi, moim zdaniem, osiągnięciami wynikającymi z opisanych badań było (1) otrzymanie unikatowych materiałów roślinnych, tj. mieszańców somatycznych dla form uprawnych ziemniaka i dzikiego gatunku *S. x michoacanum* oraz autofuzantów formy dzikiej; (2) identyfikacja w puli wygenerowanych

materiałów osobników odpornych na zarazę ziemniaka; (3) kompleksowa analiza struktury genomu jądrowego mieszańców somatycznych i atofuzantów z wykorzystaniem platformy markerów DArT; (4) kompleksowa analiza cytoplazmatycznego DNA w oparciu o markery specyficzne dla DNA mitochondrialnego i chloroplastowego; (5) otrzymanie płodnych i odpornych na *Phytophthora infestans* roślin BC₁ i F₁.

W przeglądzie literatury, mimo jego właściwej struktury, znalazłam pewne nieścisłości. Na str. 11. czytamy, że „bariery krzyżowalności dzieli się, na pre- i postzygotyczne czyli zachodzące przed lub po powstaniu zarodka”. Raczej należałoby powiedzieć przed lub po zapłodnieniu, względnie przed- lub pozapłodnieniowe, gdyż bariery prezygotyczne uniemożliwiają dotarcie łagiewki do woreczka zalążkowego, podczas gdy bariery postzygotyczne to zakłócenia zachodzące w okresie od syngamii do powstania dojrzałego zarodka. Na str. 12 Doktorantka pisze, że „roślinne gamety męskie (mikrospory) powstają w procesie mikrosporogenezy.” Jest to dosyć niefortunny skrót myślowy, bo roślinne gamety męskie to plemniki i powstają one w procesie mikrogametogenezy czyli rozwoju ziarna pyłku z mikrospory. A mikrosporogeneza, jak sama nazwa wskazuje, to proces powstawania mikrospor (czyli małych zarodników charakterystycznych dla męskiej linii płciowej począwszy od paprotników różnozarodnikowych). Nie do końca mogę się także zgodzić ze stwierdzeniem na str. 13., że „cytoplazmatyczna męska sterylność to zjawisko zaburzenia mikrosporogenezy, którego konsekwencją jest powstawanie niefunkcyjnych ziaren pyłku”. Np. u marchwi, ale nie tylko, znany jest CMS typu petaloidalnego, gdzie zamiast pręcikowia są dodatkowe płatki korony, czyli w ogóle nie tworzą się KMP, a tym samym mejoza nawet się nie rozpoczyna. Na tej samej stronie Doktorantka pisze, że „odmiany ziemniaka [...] wytwarzają małe ilości ziaren pyłku, które nie rozdzielają się w procesie mikrosporogenezy, tworząc charakterystyczne tetrady...” co jest kolejnym uproszczeniem, gdyż po zakończeniu mejozy to nie ziarna pyłku uwalniają się z tetrad (bo ich jeszcze nie ma) tylko mikrospory. W kontekście fuzji protoplastów raczej bardziej wskazanym jest używać sformułowania „łączenie odległych taksonomicznie gatunków” niż „krzyżowanie” (str. 15), rezerwując je do rozmnażania generatywnego.

KOMENTARZE I PYTANIA

Podczas lektury recenzowanej rozprawy nasuwają się następujące komentarze i pytania. Oto niektóre z nich:

1/ Proszę doprecyzować, w jakim systemie kultury prowadzono mieszaninę pofuzyjną, tzn. czy komórki zawieszano bezpośrednio w pożywce płynnej, czy być może je immobilizowano w stałym podłożu? Czy określano wydajność kultury po przeprowadzeniu fuzji protoplastów? Jak wiele komórek ponownie włączało się w cykl podziałów mitotycznych? W jakim stopniu i czy w ogóle wydajność kultury mieszaniny pofuzyjnej różniła się od klasycznej kultury protoplastów ziemniaka? Po jakim czasie od fuzji protoplastów pojawiały się mikrokalusy?

2/ Selekcja produktów fuzji na wczesnych etapach kultury, np. heterokarionów tuż po elektrofuzji, pozwala na prowadzenie precyzyjnie wybranych linii komórkowych poprzez odrzucenie homokarionów i komórek, które fuzji nie uległy. Jest to jest wskazane działanie, bo chociażby pozwala nagromadzić większą liczbę potencjalnych mieszańców, poprzez przeprowadzenie większej liczby eksperymentów fuzji i dalsze prowadzenie mniejszej liczby, ale wyselekcjonowanych materiałów. W oparciu, o jakie techniki można prowadzić wczesną selekcję produktów fuzji i czy Doktorantka podejmowała próby wykorzystania którejs z takich technik w swoich badaniach?

3/ Ploidalność większości mieszańców somatycznych oszacowano metodą pośrednią, poprzez pracochłonne liczenie chloroplastów w komórkach szparowych liści. Dlaczego taką właśnie metodę zastosowano? Jakie inne, dokładniejsze metody można zastosować do określenia ploidalności lub zawartości DNA otrzymanych roślin? Co wiadomo na temat zawartości DNA komponentów rodzicielskich?

4/ Czy Doktorantka badała jak zachowują się chromosomy otrzymanych mieszańców somatycznych w mejozie? Co wiadomo na temat koniugacji chromosomów u mieszańców somatycznych uprawnych i dzikich form ziemniaka? Wygenerowany przez Doktorantkę materiał jest tak ciekawy i unikatowy, że w przyszłości warto by rozważyć badania nad fizyczną strukturą ich chromosomów.

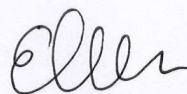
Postawione wyżej pytania wynikają raczej z mojej ciekawości i chęci przedyskutowania niektórych zagadnień w trakcie obrony rozprawy doktorskiej i w żaden sposób nie podważają mojej dobrej opinii o merytorycznej wartości rozprawy mgr Pauliny Smydy-Dajmund.

PODSUMOWANIE

Przedstawioną mi do oceny rozprawę Pani Pauliny Smydy-Dajmund, mimo wskazanych powyżej drobnych uwag, oceniam bardzo wysoko. Jest ona wartościowym opracowaniem, które spełnia wymagania ustawowe stawiane pracom doktorskim. Wskazuje na bardzo dobre

przygotowanie teoretyczne Autorki w zakresie prowadzonych badań, tj. w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie agronomii, oraz na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, której odzwierciedleniem jest właściwe sformułowanie hipotez naukowych i celów badawczych, prawidłowe zaplanowanie eksperymentów, zastosowanie odpowiednich metod badawczych oraz wielopłaszczyznowa analiza otrzymanych wyników i ich wnikliwa dyskusja. Przedstawione badania cechują się wysokim poziomem naukowym i wnoszą nowe informacje do wiedzy z zakresu somatycznej hybrydyzacji roślin uprawnych. Otrzymane wyniki są oryginalne i bez wątpienia zawierają element nowości naukowej.

Podsumowując uważam, że złożona dysertacja spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w *Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki* oraz w *Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa wyższego z dnia 30 października 2015 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora*. **Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Smydy-Dajmund do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie z uwagi na fakt, że podstawę rozprawy stanowią publikacje o relatywnie wysokim sumarycznym współczynniku wpływu (IF=7, 183) stawiam **wniosek o wyróżnienie pracy.**



dr hab. inż. Ewa Grzebelus