

Prof. dr hab. Adela Adamus  
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Sosnowskiej pt.**

**„Rozszerzenie puli genowej *Brassica napus* L. poprzez resyntezę rzepaku ozimego”**

*wykonanej w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych*

*Institutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR- PIB, Oddział w Poznaniu)*

### **Opis rozprawy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa Pani mgr Katarzyny Sosnowskiej została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Teresy Cegielskiej-Taras, promotorem pomocniczym była dr inż. Laurencja Szała. Praca składa się z trzech artykułów naukowych opublikowanych w latach 2014-2017, w czasopismach z listy JCR:

1. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* (IF<sub>2014</sub>=0,981; 20p MNiSzW),
2. *Breeding Science* (IF<sub>2016</sub>=1,792; 30p MNiSzW)
3. *Euphytica* (IF<sub>2016</sub>=1,626; 35p MNiSzW).

Publikacje te zawierają spójny tematycznie zestaw badań nad resyntezą rzepaku. Są autorstwa od 2 do 8 osób, a Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch z nich. Do pracy dołączone są oświadczenia autorów, wskazujące na znaczący udział mgr K. Sosnowskiej w powstaniu tych publikacji. Autorka wykonywała część eksperymentalną prac, brała udział w obliczeniach statystycznych oraz opracowywała wyniki przeprowadzonych badań.

W recenzowanej pracy oprócz trzech wymienionych wyżej publikacji, stanowiących jej główny element, znajdują się rozdziały wprowadzające i porządkujące wiedzę na temat pochodzenia, hodowli i zasobów genetycznych rzepaku. Tytuł pracy został prawidłowo sformułowany, a poszczególne rozdziały, których jest XI przedstawione są w logicznej kolejności. Są to: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, streszczenia w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, cel badań, krótkie omówienie wyników, podsumowanie i wnioski oraz spis literatury. Powstała w ten sposób wartościowa rozprawa, o spójnej tematyce badań nad poszerzeniem zmienności genetycznej rzepaku i wykorzystaniem otrzymanych mieszańców oddalonych w hodowli heterozyjnej u tego gatunku.

### **Tematyka badań i ich znaczenie**

Rzepak ma duże znaczenie gospodarcze w Polsce i na świecie, jest gatunkiem, u którego postęp biologiczny w wyniku hodowli jest najbardziej spektakularny wśród roślin rolniczych. Uprawiane odmiany zwane podwójnie ulepszonymi („00”), charakteryzują się niską zawartością kwasów tłuszczowych nasyconych, bez kwasu erukowego oraz niską zawartością glukozyrolanów, co ma duże znaczenie w dietetyce, a także w przemyśle paszowym. Programy hodowlane rzepaku opierają się przede wszystkim na tworzeniu mieszańców heterozyjnych. W procesie tym wykorzystywane są różne techniki biotechnologiczne, które wspomagają tworzenie nowych odmian. W hodowli rzepaku dużym problemem jest zawężenie zmienności genetycznej wskutek dziesiątków lat intensywnej selekcji i braku dzikich form. Zmieniające się wraz z potrzebami rynku kierunki hodowli wymuszają poszukiwanie nowych źródeł zmienności genetycznej i w ten trend wpisuje się tematyka badań przedstawiona w recenzowanej rozprawie.



### Szczegółowe cele rozprawy, materiał i metody badawcze, wkład Doktorantki

Celem badań było uzyskanie zróżnicowanych genetycznie resyntetyzowanych linii rzepaku (RS), następnie użycie ich w programach hodowlanych oraz wykazanie zróżnicowania genetycznego pomiędzy obiektami otrzymanymi w wyniku resyntezy a odmianami i liniami rzepaku znajdującymi się w hodowli.

Mgr Katarzyna Sosnowska i zespół współautorów prowadzili prace nad resyntezą rzepaku z wykorzystaniem różnych podgatunków należących do *B. oleracea* i *B. rapa*. Rola Doktorantki związana była z wyprowadzeniem materiału roślinnego do doświadczeń opisanych w publikacjach. A było to zadanie żmudne i czasochłonne. Wyściowym materiałem były bowiem 2 podgatunki *Brassica oleracea* (jarmuż i kapusta brukselska) oraz 3 podgatunki *B. rapa* (rzepik, kapusta chińska i kapusta pekińska) reprezentowane przez różne odmiany. Użycie ich do dwukierunkowych krzyżowań pozwoliło otrzymać szereg zróżnicowanych genetycznie mieszańców resyntetyzowanych (RS) rzepaku, które we wszystkich trzech publikacjach były podstawą do badań. Mieszańce RS powstały w wyniku zastosowania technik zapylania *in vivo* lub *in vitro*, a następnie wykorzystania techniki *embryo rescue*. Badania te dowiodły, że resynteza rzepaku poprzez hybrydyzację międzygatunkową z wykorzystaniem technik *in vitro* jest dobrą drogą do otrzymania mieszańców RS. Metodę otrzymywania amfidiploidalnych form rzepaku opublikowano w artykule nr 1) pt. Application of *in vitro* pollination of opened ovaries to obtained *Brassica oleracea* L. x *B. rapa* L. hybrids (2014). Ponadto w badaniach tych Autorka wykazała się znajomością metod cytologicznych. Podczas analiz embriologicznych rozwoju zarodków mieszańcowych obserwowała zaburzenia w rozwoju bielma oraz obecność zdegenerowanych woreczków zalążkowych. Badania te wniosły nowe informacje do opisu trudności w otrzymywaniu mieszańców oddalonych.

Otrzymane mieszańce RS zostały włączone do hodowli poprzez krzyżowanie z liniami restorerami zawierającymi gen *Rfo* związany z CMS *ogura*, która u rzepaku służy do tworzenia mieszańców heterozyjnych. Otrzymane linie RS krzyżowano z liniami restorerami, a mieszańce F1 użyte zostały jako rośliny donorowe do androgenezy. Otrzymała w ten sposób szereg zróżnicowanych genetycznie linii DH semi-resyntetyzowanych (semi-RS). Z nich, z zastosowaniem analiz biochemicznych wyselekcjonowano takie, które posiadały gen restorer *Rfo* a zawartość kwasu erukowego i glukozyolanów odpowiadała normom odmian „dwuzerowych”. Taki sposób postępowania był nowatorski i w hodowli rzepaku zastosowany po raz pierwszy. W schematach hodowli rzepaku publikowanych w światowej literaturze, autorzy zwracają uwagę, że linie RS z powodu niekorzystnych cech agronomicznych nie mogą być bezpośrednio zastosowane w hodowli i muszą być poddane kolejnym, kilkakrotnym krzyżowaniom wstecznym. Autorka w celu stabilizacji genetycznej swoich linii semi RS użyła systemu haploidyzacji, a następnie diploidyzacji otrzymując linie DH. Metoda ta pozwoliła na skrócenie czasu otrzymania form charakteryzujących się ważnymi cechami jakościowymi oleju i śruty rzepakowej, zawierających ponadto gen restorer. Stan homozygotyczny tych form pozwolił użyć je w hodowli heterozyjnej. Jedną z takich linii DH semi-RS wykorzystano w doświadczeniach wstępnych jako komponent mieszańca F1 i otrzymano znaczny efekt heterozji. Ten sposób postępowania w procesie hodowlanym opisano w kolejnej publikacji (nr 2) pt. Development of new restorer lines for CMS *ogura* system with the use of resynthetized oilseed rape (*Brassica napus* L.) (2016).

Otrzymanie tak szerokiego spektrum genetycznie zróżnicowanych materiałów roślinnych było zadaniem, które od Doktorantki wymagało znajomości biologii, genetyki i



dziedziczenia cech u rzepaku, metod hodowli i technik krzyżowań, ale także metod *in vitro*, za pomocą których pokonano bariery krzyżowalności międzygatunkowej oraz otrzymano linie podwojonych haploidów.

Hodowla nowych odmian mieszańcowych wymaga posiadania materiału charakteryzującego się odpowiednim dystansem genetycznym. Z dużym udziałem Doktorantki, w publikacji nr 3) pt. Genetic relationships among resynthesized, semiresynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes, (2017) przedstawiono wyniki oceny polimorfizmu DNA w obrębie 100 obiektów. Były wśród nich 33 linie RS (otrzymane w wyniku 15 kombinacji krzyżówkowych *B. oleracea* x *B. rapa*), 6 linii DH semi-RS, 49 odmian i linii hodowlanych rzepaku oraz 12 form rodzicielskich do resyntezy. Z użyciem markerów AFLP i analiz statystycznych oceniono zmienność genetyczną, wydzielono grupy jednorodne genetycznie oraz określono dystans genetyczny pomiędzy grupami badanych populacji. Ważnym dla praktycznej hodowli rzepaku jest wyciągnięty z tych badań wniosek o genetycznej odmienności linii RS i DH semi-RS od rzepaku naturalnego, którego liczne formy użyto w doświadczeniu. W tym zadaniu Doktorantka wykazała się znajomością technik molekularnych oraz specjalistycznych metod analizy statystycznej.

Tak więc, Pani mgr Katarzyna Sosnowska w przedstawionych badaniach wykazała się wiedzą z wielu dziedzin nauk biologicznych oraz znajomością technik im towarzyszących i umiejętnie wykorzystała je w pracy naukowej.

**Za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki** w ocenianym zestawie publikacji uważam:

- Opracowanie metody otrzymania mieszańców RS rzepaku z wykorzystaniem kultur *in vitro* (zapylenie *in vitro*, *embryo rescue*). Otrzymaną przez Autorkę efektywność tworzenia roślin mieszańcowych wynoszącą 13% uważam za duże osiągnięcie, a wyniki analiz embriologicznych rozwoju zarodków mieszańcowych za bardzo interesujące.
- Otrzymanie licznej grupy linii RS, które stanowią pulę nowych, zróżnicowanych genetycznie genotypów *B. napus*. Na podkreślenie zasługuje fakt, że do otrzymania mieszańców RS Autorka użyła zróżnicowanych genetycznie form botanicznych i odmian należących do gatunków ancestralnych, co dało szansę na zwiększenie różnorodności.
- Wprowadzenie do hodowli metody (opracowanej ze współpracownikami), która pozwala poprzez linie DH semi-RS, na introgresję genów z otrzymanych nowych genotypów RS do istniejących linii i odmian rzepaku. Jest to metoda nowatorska w hodowli rzepaku, która pozwoliła skrócić czas otrzymywania form o wartościowych cechach, z wprowadzonym genem restorerem *Rfo*.
- Ustalenie polimorfizmu i wykazanie dystansu genetycznego (techniką AFLP) pomiędzy liniami RS, DH semi-RS oraz naturalnymi liniami i odmianami *B. napus*, *B. oleracea* i *B. rapa* co znacznie ułatwi dobór komponentów rodzicielskich w hodowli heterozyjnej.

Przedstawione osiągnięcia są ważne z punktu widzenia badań nad resyntezą rzepaku i poszerzeniem zmienności genetycznej tego gatunku. Oprócz aspektu naukowego należy zwrócić uwagę, że badania te mają także duże znaczenie dla praktycznej hodowli rzepaku.

Uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania pracy są nieliczne i stanowią raczej pytania do Doktorantki:

- Wśród trzymanyh materiałów roślinnych (linii RS i DH-semiRS) znajdują się formy o bardzo zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych czy glukozyolanów. Uważam, że jest to cenny materiał do realizacji nowych kierunków hodowli, które wymuszą zmieniające się preferencje i wymagania przemysłu chemicznego, spożywczego czy paszowego. Czy w tym zakresie będą prowadzone dalsze badania?



- Mając tak wiele mieszańców RS warto by opracować publikację pokazującą kompleksowo ich zróżnicowanie morfologiczne, biochemiczne, cytologiczne, molekularne.
- Do otrzymania mieszańców RS zastosowano 2 techniki zapyień *in vivo* i *in vitro*. Pierwsza z nich jest opisana w Sosnowska i in. 2010, a druga w Sosnowska i Cegielska-Taras 2014. Czy metody te zostały porównane na tym samym materiale doświadczalnym, która z nich jest łatwiejsza, a która bardziej efektywna? Obydwie metody w swojej drugiej części mają izolację zarodków. Czy nie wystarczyłyby kultury izolowanych zalążków?
- Pojęcie „zapylenie *in vitro* odciętych zalążni” jest nieprecyzyjne, może lepiej w polskiej nomenklaturze nazwać je zapylenie *in vitro* wewnątrzzalążniowe lub śródzalążniowe?
- Linie nazwane semi-RS są liniami DH, proponuję zachowanie przedrostka DH także w nazewnictwie polskim, gdyż to precyzuje status genetyczny otrzymanych linii. W publikacji nr 2) są opisane jako semi-RS DH lines, natomiast w nr 3) jako semi-RS lines.
- Pąki kwiatowe odkaża się (nie sterylizuje) (str 25).

Moje uwagi zawarte w recenzji nie umniejszają w żadnym stopniu poznawczego i praktycznego znaczenia omawianej pracy.

#### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że **rozprawa doktorska** Pani mgr **Katarzyny Sosnowskiej** pt. „Rozszerzenie puli genowej *Brassica napus* L. poprzez resyntezę rzepaku ozimego” **jest nowatorska i wartościowa pod względem poznawczym i aplikacyjnym**. Wykonane badania stanowią bowiem ważny przyczynek do poznania barier krzyżowalności międzygatunkowej i jej przełamywania. Autorka przedstawiła skuteczny sposób na poszerzenie zmienności genetycznej i wprowadziła metodę hodowli, która ułatwia otrzymanie form pożądaných dla hodowli heterozyjnej rzepaku, najważniejszej rośliny oleistej w Polsce.

Praca zawiera prawidłowo udokumentowane wyniki i świadczy o tym, że Doktorantka bardzo dobrze zna metody klasycznej hodowli krzyżówkowej, techniki kultur *in vitro*, oraz najnowsze techniki biologii molekularnej i potrafi prawidłowo wykorzystać je w badaniach naukowych. Opracowanie daje podstawy do dalszych badań oraz aplikacyjnego wykorzystania otrzymanych nowych form w programach hodowli rzepaku.

Reasumując, stwierdzam, że oceniana praca **spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim** przez Ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w artykule 13 Ustawy. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB o dopuszczenie mgr Katarzyny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na poznawczy i aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań oraz fakt, że zostały opublikowane w czasopismach naukowych o uznanej renomie międzynarodowej z zakresu biologii i hodowli roślin wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Kraków 2.02.2018

/Adela Adamus/