

Szczecin, 5 stycznia 2018

prof. dr hab. Piotr Masojć
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
71-434 Szczecin, ul. Słowackiego 17

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Katarzyny Sosnowskiej

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

zlecona przez Radę Naukową IHAR-PIB w Radzikowie.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią trzy publikacje w języku angielskim w renomowanych międzynarodowych periodykach naukowych.

Pierwsza z prac pt.: “ Application of in vitro pollination of opened ovaries to obtain *Brassica oleracea* L. × *B.rapa* L. hybrids”, wydana w czasopiśmie *In Vitro Cell Dev Biology-Plant* 50 z pięcioletnim IF=1,531 (roczny IF w 2014 = 0,981) stanowi opracowanie w którym udział doktorantki wynosi 80%. W ramach tego udziału doktorantka realizowała część eksperymentalną pracy, opracowała metody zapyłania in vitro i kultury in vitro zarodków, przygotowała i wykonała badania mikroskopowe, współtworzyła koncepcję badań i przygotowała manuskrypt jako autor korespondencyjny.

W tej pracy przedstawiono oryginalne i nowatorskie wyniki zastosowania zapyłania in vitro odciętych zalążni, a następnie kulturę in vitro zarodków mieszańcowych *Brassica oleracea* i *Brassica rapa*, wyjściowych gatunków dla resyntezy rzepaku. Z zapyłonych w warunkach in vitro 420 zalążni uzyskano 18% zalążków w których rozwijał się prawidłowy zarodek z bielmem. Z tych prawidłowo wykształconych zarodków po regeneracji i ukorzeniu w odpowiednich pożywkach uzyskano 13,4% wydajność wytworzenia roślin. Allopoloidalność otrzymanych roślin potwierdzono przy użyciu cytometrii przepływowej. Następnym etapem było traktowanie roślin kolchicyną w celu otrzymania di-haploidów. Otrzymane w tej

pracy rośliny mieszańcowe stanowiły materiał badawczy niezbędny do realizacji dalszych etapów badań.

W drugiej publikacji pt.: „Development of new restorer lines for CMS *ogura* system with the use of resynthesized oilseed rape.”, wydanej w czasopiśmie *Breeding Science* w roku 2016 (pięcioletni IF=1,952, roczny IF=1,792) udział doktorantki wynosił 35% i polegał na realizacji części eksperymentalnej tj. na wytworzeniu linii semi-RS do etapu zbioru nasion, obserwacji roślin w trakcie wegetacji oraz na opracowaniu i interpretacji wyników.

Praca ta miała na celu uzyskanie podwójnie ulepszonych linii DH semi-RS rzepaku ozimego zawierających gen restorujący *Rfo* oraz wykazujących genetyczne oddalenie od naturalnych form rzepaku. Skrzyżowano linie resyntetyzowane rzepaku czyli nowo utworzone mieszańce *B. rapa* z *B. oleracea* z wyselekcjonowanymi liniami restorerami w systemie CMS *ogura* rzepaku zwyczajnego. Otrzymano ok. 800 roślin semi-RS w formie podwojonych haploidów przy użyciu kultury mikrospor *in vitro*. Z tych populacji wyselekcjonowano z użyciem markera izoenzymatycznego fosfoglucoizomerazy 281 linii zawierających gen *Rfo*. Spośród roślin zawierających *Rfo* dokonano ponadto selekcji form z niską zawartością kwasu erukowego i niską zawartością glukozyolanów. W efekcie selekcji zidentyfikowano linie podwójnie ulepszonego rzepaku semi-RS. Ponadto dokonano charakterystyki zmienności genetycznej badanych linii mieszańcowych na tle form rodzicielskich i odmian klasycznych rzepaku przy użyciu techniki AFLP. Uwieńczeniem tych badań było wykazanie w toku doświadczenia dwuletniego, że poziom heterozji mieszańców z linią semi-RS jest wyższy niż z linią klasyczną rzepaku jako zapylaczem. Wyniki pracy potwierdzają duże możliwości otrzymywania cennych materiałów do hodowli rzepaku poszerzających jego pulę genetyczną i zakres heterozji z użyciem opracowanej metody wytwarzania roślin semi-RS w drodze kultur *in vitro* i selekcji wartościowych genotypów.

W trzeciej pracy cyklu składającego się na rozprawę doktorską, noszącej tytuł: „Genetic relationships among resynthesized, semi-resynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes.”, opublikowanej w roku 2017 w *Euphytica* (IF pięcioletni=1,84, roczny 1,626) udział doktorantki wynosił 51% i polegał na przygotowaniu materiału roślinnego, izolacji DNA, analizach techniką AFLP, udziałem w opracowaniu wyników i redakcją tekstu pracy – autor korespondencyjny.

Celem tej pracy była charakterystyka zmienności otrzymanych materiałów rzepaku RS i semi-RS w porównaniu ze zmiennością w obrębie materiałów klasycznych czyli odmian rzepaku. Do porównań wzięto także formy rodzicielskie *Brassica rapa* – 8 odmian i *Brassica oleracea* – 4 odmiany. Za pomocą rozległych badań techniką AFLP skonstruowano dendrogramy podobieństw genetycznych, wykazujące znaczną odrębność genetyczną materiałów syntetyzowanych w stosunku do klasycznych odmian oraz większą różnorodność genetyczną form resyntetyzowanych w porównaniu z naturalnymi formami rzepaku. Badania markerami AFLP umożliwiły także pogrupowanie badanych materiałów do czterech grup, co wykazało całkowitą odrębność genetyczną *B. rapa* w stosunku do *B. oleracea* i *B. napus*.

Wyniki badań uzyskane w toku trzech omawianych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Sosnowskiej mają dużą wartość poznawczą oraz są niezwykle wartościowe dla hodowli twórczej rzepaku, którego zmienność genetyczna ulega szybkiemu zawężeniu. Antidotum na zawężenie puli genetycznej odmian rzepaku, grożącej w przyszłości obniżką plonowania upraw tego gatunku, jest droga efektywnego wytwarzania nowych form wskazana, opracowana i przetestowana w rozprawie doktorskiej. Mgr Katarzyna Sosnowska wykazała możliwość efektywnej produkcji nowych resyntetyzowanych genotypów rzepaku w drodze zapylania *in vitro*, które po skojarzeniu z formami klasycznymi dają wartościowe linie DH identyfikowane w drodze selekcji. Są one nie tylko źródłem nowej zmienności genetycznej, lecz także wykazują podwyższony w stosunku do klasycznych zapylaczy efekt heterozji.

Rozprawa doktorska została bardzo jasno zredagowana i w dużym stopniu stanowi syntezę wyników publikacji, co znacznie ułatwia ich analizę. Napisana jest poprawnym językiem polskim i przedstawia logiczny tok rozumowania. Przegląd literatury wprowadza w aktualny stan badań nad doskonaleniem genetycznym rzepaku. Wskazuje na znaczenie rzepaku w rolnictwie światowym jako jednego z najważniejszych źródeł oleju jadalnego, a także jako surowca do produkcji biopaliwa. Przedstawia etapy odkrywania ważnych genów dla doskonalenia tego gatunku w aspekcie hodowlanym czyli polepszenia jego właściwości jakościowych, użytkowych, a w tym plonowania. Podkreśla znaczenie metod biotechnologicznych w tym kultur *in vitro* i selekcji markerami molekularnymi jako nieodzownych technik wspomagających współczesną hodowlę tego gatunku.

Przedstawione cele pracy są właściwe i jasno sformułowane. Wskazują one na kompleksowe podejście do zagadnienia, w którym należało wykazać się znajomością wielu technik badawczych, opisanych w metodyce, takich jak: zapylenie międzygatunkowe w warunkach *in vitro*, prowadzenie regeneracji roślin, ukorzeniania w kulturach *in vitro*, analiza embriologiczna, selekcja prawidłowo rozwijających się zarodków i roślin na etapie kultury *in vitro*, ocena ploidalności cytometrem przepływowym, podwajanie liczby chromosomów przez kolchicynowanie, prowadzenie doświadczeń polowych, ocena zmienności sekwencji DNA z użyciem markerów AFLP, ocena dystansu genetycznego i podobieństwa pul genetycznych.

Wyniki poszczególnych publikacji zostały syntetycznie opisane oraz dodatkowo podsumowane w osobnym rozdziale. Wnioski są prawidłowo sformułowane i podkreślają znaczenie osiągnięć badawczych dla praktyki hodowlanej. Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim jest opracowane syntetycznie i wzorcowo. Opracowanie liczy 48 stron i przytacza 63 pozycje literatury światowej, dotyczącej badań genetycznych i hodowli rzepaku.

Dodatkowo załączone są oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład cyklu, pozwalające prawidłowo ocenić wkład pracy doktorantki w poszczególne artykuły naukowe.

Na ich podstawie widać wiodący wkład pracy mgr Katarzyny Sosnowskiej w całość badań zrealizowanych w ramach cyklu 3 publikacji. Sumaryczny IF tych prac wynosi 5,323 (średni pięcioletni IF) oraz 4,399 (roczny IF), co należy uznać za bardzo dobry wynik.

Na podkreślenie zasługuje bardzo silne zakotwiczenie tematyki rozprawy doktorskiej w istotnym i bardzo aktualnym nurcie hodowli twórczej rzepaku jakim jest poszukiwanie nowych źródeł zmienności genetycznej poprzez sięgnięcie do syntetyków i semi-syntetyków. Jest to niewątpliwie zasługa promotor pracy Pani prof. dr hab. Teresy Cegielskiej-Taras, natomiast doktorantka wywiązała się z realizacji tych zadań wzorowo, udowadniając opanowanie złożonego warsztatu badawczego prac biotechnologicznych i genetycznych. Największym atutem tych prac jest fakt, iż zakończyły się pełną realizacją założonych celów badawczych choć były one niełatwe i wysoce złożone.

Nie mam zastrzeżeń ani uwag szczegółowych do ocenianej rozprawy.

Natomiast oczekuję od Doktorantki odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy wysoce obiecujące wyniki Pani prac w toku dalszych badań potwierdziły swoją wartość dla praktycznej hodowli rzepaku ?
2. Czy udało się uzyskać linie zapylaczy semi-RS, które nie tylko przewyższają klasyczne linie efektem heterozji, ale też dają lepiej plonujące mieszańce lub mieszańce o poprawionej jakości?

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Katarzyny Sosnowskiej reprezentuje wysoki poziom naukowy i jest znaczącym osiągnięciem w dyscyplinie agronomii a szczególnie wnosi istotny wkład do genetyki i hodowli rzepaku. Stwierdzam, iż recenzowana rozprawa spełnia wymagania ustawowe stawiane rozprawom doktorskim (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - Dz. U. Nr 65 poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę do Rady Naukowej IHAR-PIB w Radzikowie o dopuszczenie mgr Katarzyny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KATEDRY
P. Maszyński
Prof. dr hab. Piotr Maszyński