

prof. dr hab. Rafał Barański  
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Al. 29 Listopada 54  
31-425 Kraków

## Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Sandry Cichorz**  
pt. „**Charakterystyka cytogenetyczna i molekularna**  
**wybranych gatunków z rodzaju *Miscanthus* Anderss.**”

### Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z trzech artykułów prezentujących oryginalne wyniki badań naukowych i opublikowane w języku angielskim w czasopismach naukowych rozpowszechniających wyniki z zakresu dziedziny i dyscyplin związanych z naukami o roślinach, w tym agronomią i roślinami uprawnymi oraz biotechnologią. Są to uznane czasopisma naukowe, o czym świadczą ich różne wskaźniki bibliometryczne. Prezentowane artykuły są udostępnione publicznie, pobierane i cytowane przez innych autorów, z wyjątkiem jednego artykułu, który z faktu opublikowania w 2018 roku oczywiście nie mógł być jeszcze zacytowany. Zestawienie wskaźników dokumentuje poniższa tabela.

<b>Tytuł artykułu</b>	<b>Rok</b>	<b>Czasopismo</b>	<b>Wskaźniki czasopisma</b>	<b>Cytowania artykułu</b>
<i>Miscanthus</i> : genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers	2014	Molecular Biotechnology	IF = 1,876 SJR = Q2 MNiSW = 25	WoS = 11 Scopus = 16 GoogleScholar = 28 ResearchGate = 21
<i>Miscanthus</i> : inter- and intraspecific genome size variation among <i>M. x giganteus</i> , <i>M. sinensis</i> , <i>M. sacchariflorus</i> accessions	2015	Acta Biologica Cracoviensia series Botanica	IF = 0,625 SJR = Q3 MNiSW = 20	WoS = 3 Scopus = 4 GoogleScholar = 3 ResearchGate = 2
<i>Miscanthus x giganteus</i> : regeneration system with assessment of genetic and epigenetic stability in long-term <i>in vitro</i> culture	2018	Industrial Crops and Products	IF = 3,181 SJR = Q1 MNiSW = 40	WoS = 0 Scopus = 0 GoogleScholar = 3 ResearchGate = 0

Mgr inż. Sandra Cichorz jest współautorem w każdym z załączonych artykułów, wymieniona zawsze jako pierwsza w spisie autorów oraz jako autor korespondencyjny, co sugeruje jej znaczący wkład w powstanie publikacji. Do rozprawy dołączone zostały oświadczenia wszystkich współautorów o ich wkładzie w wykonanie badań oraz przygotowanie publikacji. Podany opis wkładu mgr inż. S. Cichorz jest zgodny z informacją

zawartą w klauzulach opublikowanych artykułów, jest komplementarny z opisem wkładu pozostałych współautorów oraz informuje o szacowanym wkładzie procentowym na poziomie 75%, 50% oraz 70% w kolejnych pracach. Informacje te potwierdzają wiodącą rolę mgr inż. S. Cichorz we wszystkich etapach prowadzonych badań tj. w planowaniu, prowadzeniu materiału roślinnego, przeprowadzaniu eksperymentów i wykonywaniu analiz, opracowywaniu wyników, interpretacji wyników oraz przygotowaniu tekstów publikacji.

Rozprawa oprócz wymienionych artykułów zawiera opis merytoryczny przybliżający problematykę badawczą w oparciu o przegląd literatury światowej, skrócony opis wymienionych artykułów, wnioski wynikające z przeprowadzonych badań oraz uzasadniający dobór artykułów wchodzących w skład rozprawy. Rozprawa została opatrzona wykazem źródeł finansowania badań, spisem treści, streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz spisem wykorzystanej literatury.

Analiza jednoznacznie wskazuje, że przedstawiona rozprawa spełnia wymagania formalne.

### Opis części merytorycznej rozprawy

Część merytoryczna rozprawy obejmuje, poza streszczeniami w języku polskim i angielskim, 13-stronicowy przegląd literatury, sformułowane cele badań, ośmio-stronicowy opis wykorzystanych materiałów i metod, skrócone omówienie wyników każdej z prezentowanych publikacji, podsumowanie wszystkich wyników i osiem wniosków. Opracowanie zakończone jest wykazem 86 publikacji praktycznie w całości anglojęzycznych i w znaczącej części opublikowanych w ostatnich latach. Całość obejmuje 42 strony i jak wspomniano powyżej jest uzupełnieniem omawiającym trzy publikacje zamieszczone w rozprawie.

Przeгляд literatury jest ściśle związany z tematyką rozprawy i przedstawia różne zagadnienia dotyczące rodzaju *Miscanthus*. Autorka omawia taksonomię, pochodzenie i występowanie gatunków *Miscanthus*, ich znaczenie dla człowieka i wykorzystanie jako źródła surowca energetycznego oraz w celach dekoracyjnych. Następnie omawia historię hodowli form uprawnych miskanta. Podrozdziały te stanowią wartościowe przybliżenie dotychczasowej wiedzy ogólnej przydatnej do scharakteryzowania obiektu badań i można je uznać za wspólne wprowadzenie do wszystkich trzech artykułów ujętych w rozprawie. Kolejne podrozdziały poświęcone są specyficznym zagadnieniom tematycznie nawiązującym do poszczególnych artykułów. Omawiają one zróżnicowanie rodzaju miskanta, w tym na poziomie molekularnym i cytogenetycznym, metody rozmnażania, szczególnie *M. x giganteus* z uwzględnieniem kultur *in vitro*, zmienność indukowaną w trakcie kultur *in vitro* i molekularne metody jej oceny. Podrozdziały te uwypuklają dotychczasową wiedzę oraz aspekty wymagające głębszego poznania ukierunkowując czytelnika na problemy badawcze, które zostały podjęte przez Autorkę.

Rozdział Materiał i metody opisuje obiekty badań, układy doświadczalne, metody eksperymentalne i procedury analityczne, a także metody analizy uzyskanych danych eksperymentalnych. Poszczególne podrozdziały szczegółowo opisujące materiały i wymienione metody są zgodne z tekstami zawartymi w trzech artykułach łącząc treści wspólne. Dzięki temu Doktorantka uniknęła zbędnych powtórzeń przy omawianiu poszczególnych artykułów, a tekst jest syntetyczny i przejrzysty.

Kolejny rozdział podzielony na trzy części opisuje skrótowo cele i uzyskane wyniki przeprowadzonych badań ujęte w trzech dołączonych artykułach. Każdą z nich przedstawia wyniki wraz z interpretacją wskazując na najważniejsze aspekty i znaczenie osiągniętych rezultatów. Poświęcenie odrębnego podrozdziału każdemu artykułowi jest w pełni uzasadnione. Wynika ono z faktu, że pomimo prowadzenia badań na tych samych obiektach, każdy artykuł dotyczy innego zagadnienia badawczego i ich odrębny opis ułatwia zapoznanie się z pełnymi tekstami publikacji. Dwa ostatnie rozdziały stanowią podsumowanie badań oraz wypunktowane najważniejsze wnioski.

Cały tekst części merytorycznej został przygotowany w sposób czytelny, z jasną strukturą rozdziałów oraz z zastosowaniem prostych i estetycznych stylów edytorskich nadających całości przejrzysty układ, w którym czytelnik może się łatwo zorientować. Autorka zwróciła uwagę na reguły redakcyjne tekstu unikając np. wiszących wyrazów czy wierszy co podkreśla staranność przygotowania rozprawy napisanej poprawnym językiem. Natomiast recenzent dopatrywał się błędów językowych w opublikowanym artykule z roku 2015, np., niewłaściwie odmieniona forma czasownika nieregularnego czy błędy literowe zmieniające znaczenie wyrazu. Zadaniem wydawnictwa było skorygowanie oczywistych błędów językowych na etapie składu publikacji, nie zdejmuje to jednak odpowiedzialności z autorów.

### Ocena merytoryczna rozprawy

Podjęta problematyka badawcza dotyczy gatunków z rodzaju *Miscanthus*, traw o dużych walorach dekoracyjnych i charakteryzujących się bardzo szybkim wzrostem, pomimo małych wymagań glebowych. Dzięki tej właściwości, miskant stał się pożądaną rośliną z przeznaczeniem do produkcji biomasy stanowiącej surowiec energetyczny jak również dla innych zastosowań przemysłowych. Uprawę tej rośliny w Europie i Polsce rozpoczęto zaledwie 25-35 lat temu, stąd wiedza o niej, a w szczególności w zakresie doskonalenia odmian jest mocno ograniczona. Wyzwaniem dla nauki i praktyki jest uzyskanie nowych odmian przystosowanych do zróżnicowanych warunków klimatyczno-glebowych oraz jednocześnie zapewniających wysoką produkcję biomasy o pożądanym parametrach energetycznych. Doktorantka wskazuje w rozprawie właśnie na słabo rozwinięte programy hodowli odmian miskanta jako główny czynnik motywujący do poznania genetycznych i cytogenetycznych różnic występujących pomiędzy gatunkami oraz w obrębie gatunków tej rośliny. Wiedza o zróżnicowaniu genetycznym jest niezwykle istotna dla określenia możliwości doskonalenia, doboru metod tworzenia nowych kombinacji genetycznych oraz reprodukcji. Chociaż przedstawiony przegląd literatury w tym zakresie jest wyczerpujący uważam, że wartościowe byłoby zamieszczenie także opisu szczegółowych celów hodowli twórczej tj. omawiającego konkretne cechy wymagające poprawy w dostępnych materiałach, aby na obecną chwilę i w przyszłości nowe odmiany zaspokajały potrzeby produkcji na cele energetyczne w warunkach europejskich i w Polsce.

W rozprawie zaprezentowane zostały wyniki badań podstawowych nad poznaniem zmienności w rodzaju *Miscanthus*. Cytogenetyczny aspekt badania różnorodności wynika z faktu występowania gatunków o różnym stopniu ploidalności oraz z występowania gatunków będących mieszańcami powstałymi na drodze hybrydyzacji form diploidalnych i tetraploidalnych, jak *M. x giganteus*. Istnieją zatem bezpłodne tri- i pentaploidalne formy, które wymagają rozmnażania wegetatywnego. Z tego też względu zróżnicowanie genetyczne może być bardzo niewielkie pomiędzy dostępnymi materiałami, a zmienność niewystarczająca dla tworzenia nowych odmian. Szczegółowa wiedza obejmująca

charakterystykę molekularną i cytogenetyczną może ułatwić dobór komponentów rodzicielskich dla przyszłych programów hodowli. Stąd uważam, że cele badań postawione przez Doktorantkę są w pełni uzasadnione i ważne. Odrębnym zagadnieniem jest możliwość efektywnego rozmnażania wegetatywnego. Doktorantka część swojej pracy poświęciła sprawdzeniu różnych warunków prowadzenia kultur *in vitro* miskanta celem opracowania efektywnej metody mikrorozmnażania. Optymalizacja metody wiąże się zwykle z określeniem także ewentualnych skutków ubocznych, do których można zaliczyć zmiany genetyczne i epigenetyczne pojawiające się w trakcie prowadzenia kultury. Dlatego dodatkowe cele mające określić czy zmiany takie zachodzą, a jeśli tak to z jaką częstością, są w pełni uzasadnione i cenne.

W efekcie sformułowania celów, Doktorantka zrealizowała badania z użyciem kolekcji 18 obiektów trzech gatunków *Miscanthus*, które dotyczyły: 1) oceny zmienności międzygatunkowej i wewnątrzgatunkowej na poziomie cytogenetycznym, 2) analogiczne badania na poziomie DNA oraz 3) optymalizacji mikrorozmnażania oraz określenia zmian genetycznych i epigenetycznych w kulturach *in vitro* *M. x giganteus*. Wyniki tych badań opublikowane w trzech artykułach są ze sobą logicznie powiązane i stanowią spójny zbiór opisany trafnie dobranym przez Doktorantkę wspólnym tytułem.

Dobór materiału do badań był uzasadniony znaczeniem poszczególnych gatunków, w tym faktem, że *M. x giganteus* jest mieszańcem *M. sinensis* i *M. sacchariflorus*, i wszystkie te trzy gatunki zostały ujęte w badaniach. Najliczniej reprezentowany był miskant chiński przez 12 odmian, natomiast miskant olbrzymi przez cztery kolny, a miskant cukrowy przez dwa ekotypy. Należy zatem zauważyć, że poszczególne gatunki były reprezentowane przez znacznie różną liczbę obiektów, co zapewne wynikało z dostępnej, ale ograniczonej kolekcji, jednak powodowało, że dwa z badanych gatunków, a zwłaszcza miskant cukrowy, były słabo reprezentowane. Zatem, polemizowałbym czy skład wykorzystanej kolekcji pozwala na badanie różnicowania genetycznego jeżeli takson reprezentowany jest tylko przez dwa obiekty. Moim zdaniem należy raczej mówić o różnicy pomiędzy wybranymi formami niż uogólniać i wyciągać wnioski ekstrapolowane na cały gatunek, gdyż badane dwa obiekty nie muszą być reprezentatywne. Należy się również spodziewać, że rozszerzenie badanej kolekcji o kolejne obiekty prowadziłyby do wykazania większej zmienności, bowiem brak jest podstaw aby zakładać, że wybrane dwa obiekty miskanta cukrowego charakteryzują się wartościami skrajnymi definiującymi zakres zmienności w obrębie tego gatunku. Tym samym ujęcie dodatkowego jednego czy więcej obiektów w danym taksonie w znaczący sposób mogłoby wpłynąć na uzyskane i przytaczane w pracy wartości współczynników podobieństwa genetycznego. Powyższa uwaga nie umniejsza znaczeniu uzyskanych wyników lecz raczej zwraca uwagę na konieczność bardziej krytycznej interpretacji. Należy przyznać, że krytyczna dyskusja wyników pod tym względem jest widoczna w zamieszczonych artykułach, co już niekoniecznie zostało przywołane w opisie merytorycznym. Biorąc pod uwagę cele badań, dobór obiektów uważam za właściwy, gdyż badana kolekcja obejmuje te formy, które są dostępne dla przyszłych prac hodowlanych.

Dobór metod wykorzystanych w badaniach był adekwatny to stawianych celów. Obejmują one liczenie chromosomów i pomiary ilości DNA z użyciem cytometrii przepływowowej jak również metodę pośrednią szacowania ploidalności na podstawie charakterystyki aparatów szparkowych. Są to metody powszechnie wykorzystywane i właściwe. Ocena zmienności genetycznej była wykonana na podstawie rozdziału produktów amplifikacji DNA uzyskanych metodą RAPD i ISSR. Niewątpliwie obie metody są spotykane w literaturze do oceny zmienności genetycznej. Metoda ISSR uważana jest za bardziej informatywną i wiarygodną, chociaż jest już coraz rzadziej stosowana. Natomiast metoda RAPD historycznie była powszechnie wykorzystywana, a obecnie rzadko, co wynika z małej

wiarygodności otrzymywanych wyników oraz niskiego poziomu wykrywanych polimorfizmów, które dodatkowo pozostają niescharakteryzowane. Wykorzystanie markerów RAPD nie można zatem uznać za niewłaściwe, ale z pewnością są inne systemy markerowe czy techniki oparte o sekwencjonowanie dostarczające znacznie więcej informacji. Popularność tych ostatnich szczególnie rośnie wraz z postępem technologicznym i chociaż koszt sekwencjonowania jest już przystępny może być on zbyt wysoki do oceny dużych kolekcji. Stosując użyte systemy markerowe na pewno można wskazać powtarzalne i wiarygodne markery, jednak ocena wyników (wybór markerów) pozostaje zwykle subiektywna, zwłaszcza gdy detekcja produktów amplifikacji odbywa się wizualnie (np. przy użyciu elektroforezy w agarozie). Stąd też krytycznie należy interpretować niewielkie różnice we frekwencji alleli identyfikowanych markerami RAPD czy ISSR uznając, że mogą być przeszacowane. Z kolei niewielkie różnice polimorfizmu między produktami amplifikacji mogą pozostawać niewykryte. Wykrywanie ewidentnych różnic między badanymi obiektami na podstawie obecności lub braku produktów amplifikacji pozostaje skutecznym sposobem określania różnic genetycznych, a uzyskanie powtarzalnych wyników w niezależnych reakcjach z niezależnie izolowanym DNA podnosi wiarygodność uzyskanych wyników. Stąd uważam, że zastosowane procedury analityczne można uznać za przeprowadzone poprawnie, a wyniki pozwalają na określenie różnic genetycznych będących celem badań. Ocena zmian epigenetycznych oparta o wykorzystanie enzymów restrykcyjnych czułych na metylację cytozyny jest także właściwą metodą chociaż informuje tylko o części możliwych zmian. Podobnie jak w przypadku metod RAPD i ISSR niewykrycie różnic między badanymi obiektami nie oznacza, że takich różnic nie ma. Metody i dobór związków wykorzystanych w prowadzeniu kultur *in vitro* uważam za w pełni poprawny. Reasumując, uważam, że dobór materiału jak i metod był odpowiedni do zrealizowania postawionych celów, a doświadczenia były zaplanowane w sposób ograniczający błędy analityczne i interpretacyjne. W opracowaniu uwagę zwracają, chociaż nieliczne, nieprecyzyjne lub potoczne określenia, np. „pomiar stopnia ploidalności” (str. 18) w odniesieniu do metod pośrednich oceny ploidalności czy „płodne nasiona” (str. 19).

Chociaż wyniki badań były już przedmiotem pozytywnych recenzji przed ich opublikowaniem w czasopiśmie, chciałbym wyrazić pogląd, że wyniki analiz RAPD i ISSR wskazujące na nieco większe podobieństwo obiektu *M. floridulus* do *M. x giganteus* niż do pozostałych dwóch badanych gatunków nie jest dla mnie przekonującym argumentem aby uznać, że obiekt ten został źle sklasyfikowany i powinien być oznaczony jako *M. x giganteus*, nawet jeśli ma taką samą liczbę chromosomów i podobną budowę kwiatostanu. Brak innych przedstawicieli kwestionowanego gatunku w badaniach oraz brak wyników uzyskanych komplementarnymi i bardziej dokładnymi metodami uniemożliwia moim zdaniem tak jednoznaczne stwierdzenie. Potwierdza to przeprowadzona dyskusja w artykule na podstawie wyników innych autorów wskazująca, że jednoznaczna klasyfikacja tego gatunku pozostaje problematyczna. Być może znane są Doktorantce inne przesłanki podpierające postawiony wniosek, które nie zostały w pełni przedstawione z uwagi na ograniczoną objętość artykułu.

Inne kwestie, które byłyby ciekawe do przedyskutowania dotyczą znaczenia wykrytych zmian genetycznych i epigenetycznych w trakcie prowadzenia kultury *in vitro*. Autorka konkluduje, że w kulturach *in vitro* miskant zachowuje stabilność genetyczną pomimo, że wykryte zostały polimorfizmy DNA i zmiany metylacji. Poziom zmienności jest oczywiście określeniem względnym, zastanawiam się zatem jak znaczące zmiany musiałyby wystąpić aby postawiony w rozprawie wniosek nr 8 był przez Autorkę przeformułowany i brzmiał, że w długoterminowych kulturach *in vitro* miskanta zachodzą zmiany genetyczne lub epigenetyczne.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie uważam:


1. Określenie stopnia ploidalności i wielkości genomów obiektów w badanej kolekcji miskanta oraz wykazanie zmienności międzygatunkowej oraz różnic w obrębie gatunków.
2. Potwierdzenie, na poziomie wielkości genomu, mieszańcowego pochodzenia posiadanych klonów *M. x giganteus* jako efektu hybrydyzacji miskanta chińskiego i cukrowego.
3. Wykazanie zróżnicowania odmian miskanta chińskiego pod względem ploidalności, wielkości genomu jak i polimorfizmów DNA.
4. Wskazanie markerów ISSR przydatnych do określenia różnic genetycznych między obiektami z rodzaju *Miscanthus*.
5. Wykazanie dużego podobieństwa genetycznego klonów miskanta olbrzymiego mogącego sugerować, że klony te mają wspólne źródło pochodzenia.
6. Zoptymalizowanie składów pożywek do indukcji kalusa, regeneracji i ukorzeniania pozwalające na efektywne mikrorozmnażanie miskanta olbrzymiego.
7. Wykazanie, że istnieją zmiany genetyczne oraz epigenetyczne między roślinami miskanta olbrzymiego otrzymanymi w wyniku mikrorozmnażania *in vitro* oraz scharakteryzowanie wybranych miejsc metylacji.

Ponadto, uważam że wyniki analizy markerami ISSR i RAPD potwierdzają wniosek wyciągnięty na podstawie badań cytogenetycznych dotyczący mieszańcowego pochodzenia miskanta olbrzymiego. Prosiłbym o ustosunkowanie się Doktorantki czy taki wniosek jest uzasadniony, gdyż nie dopatrzyłem się w opracowaniu dyskusji omawiającej łącznie wyniki analiz molekularnych i cytogenetycznych pod tym kątem.

### Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa jest wartościowym dziełem naukowym opracowującym ważny problem badawczy. Całość badań jest logicznie zaplanowana i konsekwentnie zrealizowana z zastosowaniem właściwych metod pozwalających na osiągnięcie zakładanych celów i weryfikację stawianych hipotez, a uzyskane wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę. Przedstawione uwagi recenzenta mają charakter polemiczny i nie wpływają znacząco na pozytywną ocenę rozprawy. O wartości uzyskanych wyników świadczą także wielokrotne cytowania zamieszczonych w rozprawie artykułów przez innych autorów. Przedstawiona rozprawa niewątpliwie dokumentuje także wiedzę mgr inż. Sandry Cichorz w dyscyplinie agronomii oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Konkludując, uważam że praca doktorska mgr inż. Sandry Cichorz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a rozprawa spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. W związku z powyższym, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr inż. Sandry Cichorz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
prof. dr hab. Rafał Barański