

Warszawa, 9.07.2018 r.

Prof. dr hab. Anna Mikuła
Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – CZRB w Powsinie
ul. Prawdziwka 2
02-973 Warszawa

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Sandry Cichorz

**stanowiącej zbiór publikacji pt. „Charakterystyka cytogenetyczna i molekularna
wybranych gatunków z rodzaju *Miscanthus* Anderss.”.**

**Praca wykonana w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych IHAR-PIB,
Oddział w Bydgoszczy, pod kierunkiem dr hab. Marii Goški, prof. nadzw. IHAR-PIB**

Tematyka badań i jej znaczenie

Kluczowym problemem światowej gospodarki jest uczynienie jej bardziej energooszczędną i przyjazną dla klimatu i środowiska. Szereg działań w tym kierunku zostało poczynionych przez Komisję Europejską, która z jednej strony narzuca rygor wdrażania gospodarki niskoemisyjnej, z drugiej zaś poszukuje racjonalnych pod względem kosztów sposobów realizacji tego zadania. Droga osiągnięcia 80-procentowej redukcji emisji gazów cieplarnianych do 2050 r. (w stosunku do poziomu z roku 1990) wiedzie m.in. poprzez pozyskiwanie energii ze źródeł odnawialnych, w tym z biomasy. Obiektem badań rozprawy doktorskiej Pani mgr Sandry Cichorz są trawy z rodzaju *Miscanthus*, które obok krzewów i drzew łatwo odrastających po ścięciu (np. wierzba, topola), bylin (np. ślazier, topinambur) i innych traw wieloletnich (np. proso różgowate) są źródłem biomasy dla pozyskiwania energii odnawialnej. Mają one także szereg innych zastosowań m.in. w przemyśle celulozowym, budowlanym i chemicznym, a dzięki walorom dekoracyjnym znalazły również zastosowanie w ogrodnictwie. Niewielka wiedza o zróżnicowaniu genetycznym komponentów rodzicielskich używanych do krzyżowań utrudnia prowadzenie prac hodowlanych nad poszerzaniem puli genetycznej tych roślin. Dodatkowo, w przypadku najczęściej używanego jako źródło biomasy miskanta olbrzymiego (naturalnego mieszańca pomiędzy diploidalnym miskantem chińskim a tetraploidalnym miskantem cukrowym), jego sterylność praktycznie uniemożliwia wprowadzenie nowych cech na drodze hodowli krzyżówkowej. Wykorzystanie kultur *in vitro* w przypadku tej grupy roślin jest więc kluczowe nie tylko dla intensyfikacji klonalnego rozmnażania, lecz także dla poszerzenia dostępności technik stosowanych w celu modyfikowania ich puli genetycznej i wyprowadzania nowych genotypów. Podjęta w niniejszej pracy problematyka badawcza skupiona na poznaniu zróżnicowania genetycznego w obrębie genotypów *Miscanthus* zgromadzonych w kolekcji IHAR-PIB Oddział w Bydgoszczy oraz opracowaniu systemu regeneracji *in vitro* jednego z klonów *M. x giganteus* wpisuje się w problemy wspomniane powyżej. Uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze i stanowią podstawę do prowadzenia dalszych badań nad poszerzaniem puli genetycznej traw z rodzaju *Miscanthus* i zabezpieczaniem ich bioróżnorodności. Znajomość zróżnicowania genetycznego populacji pozwala także na właściwe zarządzanie jej zasobami genowymi.

Opis formalny rozprawy

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pani mgr Sandry Cichorz składa się z trzech spójnych tematycznie publikacji, które ukazały się w latach 2014-2018 w czasopismach notowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR), tj. *Molecular Biotechnology*, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* i *Industrial Crops and Products*. Sumaryczny pięcioletni współczynnik wpływu tych czasopism wynosi 6,11, co odpowiada 85 punktom MNiSW. Każda z publikacji ma trzech współautorów. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Z załączonych do dokumentacji oświadczeń współautorów artykułów wynika jednoznacznie dominująca rola Pani mgr S. Cichorz w przeprowadzeniu badań, wykonaniu analiz oraz opracowaniu i interpretacji wyników. Ponadto wyraźnie podkreślony jest Jej znaczący udział w przygotowaniu publikacji do druku. Procentowy udział Doktorantki w powstaniu artykułów wynosi: 75%, 70% i 50%. Zestawienie powyższych prac nie budzi wątpliwości. Stanowią one bowiem zwartą wieloaspektową charakterystykę zróżnicowania genetycznego w obrębie genotypów rodzaju *Miscanthus* zgromadzonych w kolekcji polowej oraz w kulturze in vitro Instytutu, w którym prowadzone były badania. Publikacje stanowiące dysertację zostały poprzedzone 50-stronicowym podsumowaniem, na które składają się: streszczenie w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, przedstawienie założeń pracy, hipotez oraz cel badań, omówienie wyboru materiału roślinnego i metod badawczych, omówienie wyników przedstawionych w poszczególnych publikacjach. Podsumowanie uzyskanych wyników, wnioski i spis literatury zamykają część opisową dysertacji. Opracowanie jest przygotowane bardzo starannie, napisane poprawną, ładną polszczyzną.

Cele rozprawy, metodyka badawcza i osiągnięte rezultaty

Głównym celem badań podjętych przez Panią mgr Sandrę Cichorz było cytogenetyczne i molekularne scharakteryzowanie zróżnicowania genetycznego w obrębie rodzaju *Miscanthus* oraz opracowanie systemu kompleksowej regeneracji w kulturze in vitro wybranego klonu miskanta olbrzymiego wraz z oceną (epi-)genetycznej stabilności otrzymanych roślin. Materiał roślinny, na który składa się 18 genotypów reprezentowanych przez 4 klony *M. × giganteus*, 2 ekotypy *M. sacchariflorus* i 12 odmian *M. sinensis*, pochodzi z kolekcji polowej IHAR-PIB, Oddział w Bydgoszczy i od 25 lat stanowi podstawę badań nad produktywnością plantacji energetycznych w Polsce. Zrealizowanie założonych celów było możliwe dzięki zastosowaniu odpowiednich metod badawczych.

W pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy Doktorantka wykorzystując markery molekularne ISSR i RAPD opracowała wiarygodne i powtarzalne profile DNA pozwalające na identyfikację osobniczą i gatunkową roślin z rodzaju *Miscanthus* oraz oszacowanie zróżnicowania w obrębie badanych genotypów. Wykorzystując cytometrię przepływową określiła względną zawartość jądrowego DNA oraz ploidalność roślin. Doktorantka przetestowała w pracy 38 starterów ISSR i 26 starterów RAPD, z których kolejno: 15 i 11 generowało czytelne profile rozdziałów elektroforetycznych. Ostatecznie wskazane zostały 4 startery (jeden starter ISSR i trzy RAPD), których użycie pozwala na identyfikację genotypów miskanta zgromadzonych w kolekcji. Zastosowane metody badawcze ujawniły błędne opisanie jednego z osobników (tj. *M. floridulus*), który ostatecznie

został zaklasyfikowany jako *M. x giganteus*. O wysokiej wartości wyników badań opublikowanych w niniejszej pracy i aktualności podejmowanych zagadnień może świadczyć liczba cytowań publikacji, która wg Google Scholar wynosi 27, zaś wg Scopus 16. Druga publikacja jest kontynuacją oceny zróżnicowania gatunkowego w kolekcji polowej miskanta. Doktorantka oszacowując współczynnik korelacji pomiędzy zawartością jądrowego DNA, ploidalnością, liczbą chromosomów i długością aparatów szparkowych wykazała, że ostatni parametr nie może być wykorzystywany do identyfikacji ploidalności roślin z rodzaju *Miscanthus*. Badania pokazały bowiem brak statystycznie istotnych różnic w wielkości aparatów szparkowych pomiędzy diploidalną odmianą *M. sinensis* a dwoma triploidalnymi klonami *M. x giganteus*. Szybką i powtarzalną ocenę ploidalności miskantów zapewnia cytometria przepływową.

W ramach badań przedstawionych w trzeciej publikacji Pani mgr Sandra Cichorz wprowadziła do kultury *in vitro* prawie 2400 eksplantatów pochodzących z niedojrzałych kwiatostanów klonu 'Germany' miskanta olbrzymiego. Stosując szereg roślinnych regulatorów wzrostu (BAP, TDZ, TIBA, 2,4-D, CPA, DIC, ABA), różne ich stężenia i kombinacje wytypowała optymalne warunki kultury, które stymulują formowanie tkanki kalusowej, pędów i korzeni. Opracowana procedura regeneracji roślin drogą organogenezy zapewnia ukorzenianie na poziomie 97% i aklimatyzację z 93% efektywnością. Obszerna część tej pracy poświęcona jest ocenie (epi-)genetycznej stabilności regenerantów uzyskanych w wyniku prowadzenia krótko- i długoterminowej kultury pędów (odpowiednio: 12-18 pasaży/2-letnia kultura; 42-48 pasaży/8-9-letnia kultura). Kontrolę stanowiły 4 osobniki pochodzące z kolekcji polowej. Badania z wykorzystaniem markerów molekularnych ISSR i RAPD wykazały wysoką wartość współczynnika podobieństwa genetycznego analizowanych roślin, co wskazuje na znikome różnice między nimi. Wykorzystując technikę MS-ISSR wykazano, że całkowita liczba zmetylowanych *loci* nieznacznie różni się w regenerantach pochodzących z obu typów kultur, i jest wyższa o 2% w roślinach otrzymanych w kulturach *in vitro* w stosunku do roślin donorowych. Dziesięć prążków wykazujących odmienny status metylacji poddano klonowaniu i sekwencjonowaniu, a tożsamość ośmiu z nich potwierdzono za pomocą SCAR-PCR wykazując ich homologię do sekwencji innych roślin jednoliściennych.

Najważniejsze osiągnięcia i uwagi

Za najważniejsze wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie doktorskiej uważam:

- 1) Opracowanie warunków prowadzenia molekularnej identyfikacji traw z rodzaju *Miscanthus*, które zaowocowały wskazaniem trzech starterów RAPD i jednego ISSR wystarczających do weryfikacji przynależności gatunkowej i osobniczej.
- 2) Cytogenetyczne i molekularne opisanie zróżnicowania w obrębie kolekcji miskanta utrzymywanej w IHAR-PIB, Oddział w Bydgoszczy. Wiedza ta podnosi przydatność kolekcji w kierunku prowadzenia pogłębionych badań podstawowych i wykorzystania w praktyce, jak również lepszego zarządzania jej zasobami genowymi.
- 3) Wykazanie, że wielkość aparatów szparkowych nie jest precyzyjnym parametrem w określaniu stopnia ploidalności roślin z rodzaju *Miscanthus*.
- 4) Wykazanie, że prowadzone przez wiele lat kultury *in vitro* pędów zapewniają utrzymanie stabilności (epi-)genetycznej klonu 'Germany' miskanta olbrzymiego, co ma znaczenie np.

w opracowywaniu warunków długoterminowego gromadzenia jego bioróżnorodności z wykorzystaniem nowoczesnych narzędzi strategii ex situ.

Uwagi i pytania, które nasunęły się podczas czytania pracy:

- 1) Zamiast hipotezy naukowej została umieszczona krótka informacja na temat miskanta olbrzymiego i chińskiego. Zgodnie z definicją hipoteza jest założeniem, które wymaga sprawdzenia. Proszę Doktorantkę o przygotowanie prawidłowo postawionej hipotezy.
- 2) Zarówno w opracowaniu jak i w publikacji numer 3 Doktorantka pisze o embriogenicznym kalusie, z którego w dalszej kulturze na pożywcze regeneracyjnej pozyskiwała pędy. Na jakiej podstawie Doktorantka twierdzi, że otrzymała embriogeniczny kalus?
- 3) Proszę o syntetyczne scharakteryzowanie/porównanie procesu regeneracji roślin drogą somatycznej embriogenezy i organogenezy.
- 4) Doktorantka wspomina, że w ciągu 6 miesięcy od zaindukowania kultury in vitro otrzymano łącznie 7000 roślin. Nie jest jednak doprecyzowane, czy wspomniana wydajność regeneracji dotyczy najlepszej kombinacji użytych regulatorów wzrostu, czy raczej -jak się wydaje- całego przeprowadzonego doświadczenia. Proszę o informację ile roślin można otrzymać w optymalnych warunkach kultury z jednego inicjalnego eksplantatu klonu 'Germany' miskanta olbrzymiego? Jak ta efektywność regeneracji in vitro wygląda na tle regeneracji innych genotypów miskanta, których kultury opisano w dostępnej literaturze?

Wniosek końcowy

Podsumowując całokształt rozprawy doktorskiej wysoko oceniam wybór celu pracy, aktualność podjętej problematyki badawczej oraz konsekwencję w realizacji jej założeń. Opublikowane artykuły stanowiące dysertację wpisują się w wysoki merytoryczny poziom prac, które są od szeregu lat wykonywane w polskich laboratoriach. Doktorantka wykazała się znajomością technik molekularnych oraz specjalistycznych metod analizy statystycznej, posiadała również umiejętność prowadzenia kultur in vitro. Ponadto wykazała się zdolnością klarownego opracowywania uzyskanych rezultatów, właściwej interpretacji wyników oraz poprawnego wyciągania i formułowania wniosków. Uzyskane rezultaty dają podstawę prowadzenia dalszych badań oraz ich aplikacyjnego wykorzystania.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom, określone w art. 13 Ustawy 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 dnia 16.04.2003 r. z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr Sandry Cichorz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wartość merytoryczną pracy oraz fakt, że wyniki badań stanowiące dysertację zostały opublikowane w renomowanych czasopiśmie międzynarodowych, a jedna z nich jest licznie cytowana, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

/prof. dr hab. Anna Mikuła/