

dr hab. inż. Stefan Stojałowski  
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin  
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr **Jarosława Nowosielskiego** pt.  
**„Zróżnicowanie genetyczne odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej  
(*Phaseolus vulgaris* L.) uprawianych w Polsce”**

Zgodnie z tytułem, oceniana rozprawa zawiera opis badań zróżnicowania genetycznego w obrębie kolekcji odmian oraz uprawianych w Polsce populacji miejscowych fasoli. Badany materiał roślinny pochodził głównie z Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (tzw. banku genów) prowadzonego przez Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. Ocena zmienności genetycznej została oparta głównie o analizy na poziomie molekularnym (polimorfizm markerów AFLP odzwierciedlający zróżnicowanie w sekwencjach nukleotydów DNA). Analizowane dane zostały wzbogacone o ocenę fenotypową części materiałów badawczych.

Banki genów są we współczesnym rolnictwie ważnymi instytucjami mającymi zapobiegać „erozji genów”, tj. utracie naturalnej zmienności genetycznej, która w wyniku mniej lub bardziej świadomej działalności gospodarczej może zostać bezpowrotnie niszczone. Zainicjowane w pierwszej połowie XX wieku działania na rzecz tworzenia kolekcji roślinnych o charakterze banków genów zostały podchwyczone przez botaników i rolników na całym świecie i aktualnie mają zasięg globalny. Jest to bardzo pozytywne następstwo rozważań naukowych w wyniku których ludzkość podjęła aktywne działania, aby uchronić świat od zagrożeń stwarzanych przez rozwój gospodarczy i cywilizacyjny. Duża liczba gromadzonych i przechowywanych materiałów roślinnych zrodziła jednak nowe pytanie: o racjonalność ekonomiczną prowadzonych działań. Utrzymanie każdego obiektu w banku genów jest związane z kosztami. Koszt utrzymania pojedynczego obiektu może nie wydawać się znaczący, ale po przemnożeniu przez dziesiątki lub nawet setki tysięcy obiektów, okazuje się, że koszty działania banków genów stanowią znaczące obciążenie dla budżetów instytucji je utrzymujących. Logiczne w tej sytuacji są pytania: jaka jest tak naprawdę zmienność genetyczna w zgromadzonej kolekcji oraz czy w utrzymywanych zasobach nie znajdują się materiały, które zostały sklasyfikowane jako odrębne obiekty, ale tak naprawdę są zwykłymi duplikatami (identyczne lub prawie identyczne genotypy pobrane z różnych lokalizacji). Identyczne lub bardzo podobne genetycznie obiekty generują koszty nie wnosząc niczego istotnego dla ochrony zmienności biologicznej. Rozważania te zaowocowały ideą tworzenia kolekcji podstawowych (ang. core collection), czyli próbą ograniczenia zgromadzonych w bankach genów zasobów do możliwie małej liczby genotypów, które wciąż będą reprezentowały całą obecną w naturze zmienność genetyczną. Jednym z ważnych praktycznych celów pracy doktorskiej podjętych przez pana Jarosława Nowosielskiego było scharakteryzowanie na poziomie molekularnym zróżnicowania genetycznego obiektów przechowywanych w Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR oraz wybór obiektów do utworzenia kolekcji podstawowej fasoli zwyczajnej. Dodatkowo autor dokonał

porównania zróżnicowania genetycznego zestawu zarejestrowanych odmian uprawnych z populacjami miejscowymi oraz podjął próbę poszukania związku między pochodzeniem geograficznym zgromadzonych obiektów, a ich charakterystyką genetyczną. Uważam wykonane badania za interesujące naukowo i ważne z punktu widzenia dyscypliny „Rolnictwo i ogrodnictwo”. Ich realizacja w ramach przewodu doktorskiego prowadzonego w tej dyscyplinie w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie jest w pełni uzasadniona.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie manuskryptu o klasycznym układzie typowym dla prac eksperymentalnych. Cały manuskrypt liczy 149 stron, z czego 100 stron to zasadnicza część pracy, a resztę stanowią załączniki. Manuskrypt został przez autora podzielony na rozdziały i podrozdziały. Poza streszczeniami w języku polskim i angielskim zasadnicza część pracy obejmuje 10 rozdziałów (Wprowadzenie, Cel pracy, Przegląd piśmiennictwa, Materiał roślinny, Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis skrótów i Literatura). Ten podział nie wzbudza moich zastrzeżeń. Nieco inaczej jest z podrozdziałami, które pan Nowosielski wyróżnił w prawie każdym z w/w rozdziałów. Zapewne w zamyśle autora miało to poprawić czytelność pracy, ale w moim subiektywnym odczuciu tych podrozdziałów pojawiło się w manuskrypcie za dużo. Struktura pracy zamiast bardziej czytelna stała się przez to nazbyt złożona. Sam Spis treści zajmuje przez to ponad 3 strony. W obrębie 10 rozdziałów głównych pojawiło się 56 dodatkowych podrozdziałów, a treści zawarte w niektórych z nich są ograniczone do 1-2 zdań (np. pkt. 5.6.2 i 5.6.3 – jednozdaniowe informacje o dwóch analizach statystycznych wykonanych z użyciem tego samego programu komputerowego opisane jako dwa odrębne podrozdziały). Literatura naukowa użyta w przygotowaniu rozprawy jest obszerna, obejmuje ponad 300 pozycji. W większości są to pozycje anglojęzyczne z ostatnich lat, ale autor nie unikał też cytowania ważnych publikacji historycznych, co uważam za atut tej rozprawy.

Pierwszym rozdziałem manuskryptu jest krótkie Wprowadzenie. Nie jest to obligatoryjny element pracy doktorskiej (często wstępem do pracy jest przegląd literatury), ale umieszczenie go w maszynopisie odbieram bardzo pozytywnie. Rozdział ten informuje czytelnika o znaczeniu gospodarczym badanego gatunku i zapoznaje go z myślą przewodnią prowadzonych badań. Wprowadzenie zakończone jest Hipotezą badawczą. Bardziej adekwatnym tytułem byłaby chyba liczba mnoga, ponieważ są tu ujęte cztery zagadnienia niekoniecznie tworzące jedną hipotezę. Definiowanie hipotez badawczych ma większe znaczenie przy pracach, w których planowany jest eksperyment uwzględniający różne czynniki. W rozprawie pana magistra Nowosielskiego badany materiał nie był poddawany działaniom różnych czynników doświadczalnych, zamiast tego był po prostu badany z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod. Dlatego sformułowane w pracy cztery hipotezy brzmią dla mnie trochę sztucznie, tym bardziej że trzecia z hipotez nie była właściwie w ogóle weryfikowana (badania nie obejmowały porównania kolekcji polskich ze światowymi, więc ten problem był co najwyżej rozważany teoretycznie na drodze dyskusji z danymi literaturowymi). Osobiście wydaje mi się, że praca nic by nie straciła na pominięciu podrozdziału z hipotezami.

Kolejny rozdział „Cel pracy” stanowi dobre rozwinięcie „Wprowadzenia” i informuje o zagadnieniach badawczych, które zostały podjęte w pracy. Autor nie ustrzegł się tu pewnych niedociągnięć o charakterze językowym. Pierwszy z wyróżnionych celów sugeruje, że badana była struktura genetyczna odmian i populacji miejscowych (można domniemywać, że chodzi

o strukturę wewnątrz badanych obiektów kolekcyjnych), a tym czasem badania dotyczyły struktury genetycznej całej kolekcji składającej się z odmian i populacji (m. in. autor szukał odpowiedzi na pytanie, czy populacje miejscowe i zarejestrowane odmiany stanowiły odrębne grupy).

Przegląd piśmiennictwa stanowi trzeci, dość obszerny rozdział manuskryptu. We współczesnym świecie, którego nauka jest integralną częścią, daje się zaobserwować presja na przekazywanie odbiorcy (czytelnikowi) wyłącznie najistotniejszych informacji, które są niezbędne do zrozumienia opisywanego zagadnienia. W Przeglądzie piśmiennictwa pan Nowosielski nie poddał się tym trendom i zawarł w rozdziale wiele informacji o biologii, historii i użyteczności fasoli, które nie są niezbędne dla zrozumienia przedmiotu badań. Osobiście, jako osoba zajmująca się hodowlą zbóż przez całą zawodową część życia, chcę bardzo pochwalić doktoranta za to „pójście pod prąd”. Lektura tego rozdziału oszczędziła mi poszukiwań wielu informacji, które pozornie nie były związane z badaniami, ale okazały się przydatne do lepszego zrozumienia uzyskanych wyników pracy, a dodatkowo były często po prostu ciekawe.

Opis materiału i metod autor zdecydował się ująć w dwóch oddzielnych rozdziałach. O ile opis metod laboratoryjnym i metod analizy statystycznej sprawia wrażenie kompletnego, to charakterystyka materiału roślinnego i metod oceny fenotypowej jest dla mnie zbyt lakoniczna. Odmiany fasoli zostały poddane ocenie fenotypowej wg metodyki COBORU, ale brakuje informacji gdzie, kiedy i jak zostało założone doświadczenie. Z lektury tekstu wynika, że do badań wysiewano w szklarni po 15 nasion (dosłownie napisano na str. 28 „... wysiano po 15 roślin...” co jest oczywistym błędem językowym), ale szczegóły oceny fenotypowej nie są wyjaśnione, a do analiz molekularnych „DNA izolowano z liści 6-tygodniowych pojedynczych roślin” (str. 29). Jak wybierano te pojedyncze rośliny i czy to była tylko jedna roślina z każdego badanego obiektu, to nie jest wyjaśnione. Zgodnie z opisem założyłem, że każdy badany obiekt był reprezentowany przez pojedynczą roślinę (w kilku przypadkach pobrano materiał z tej samej rośliny w odstępach czasowych w celu zweryfikowania powtarzalności metody AFLP).

Do analiz genetycznych mgr Nowosielski wykorzystał metodę AFLP. Metoda ta została opracowana ćwierć wieku temu i w dobie wszechobecnej automatyzacji i digitalizacji może sprawiać na niektórych wrażenie anachronicznej. Autor wykazał jednak, że ta klasyczna metoda jest wciąż użyteczna i pozwala uzyskiwać wartościowe rezultaty. Jej główną wadą jest pracochłonność i konieczność wykonywania badań przez kompetentne osoby. Te wady metody AFLP przemawiają jednak na korzyść samego doktoranta. Magister Nowosielski nie byłby w stanie zrealizować swojej pracy doktorskiej, gdyby nie posiadał odpowiednich umiejętności w zakresie pracy w laboratorium biologii molekularnej, jak również w obszarze oceny i interpretowania wyników tego typu analiz.

Mnogość aktualnie dostępnych metod statystycznych do analizy danych badawczych może być postrzegana pozytywnie lub negatywnie. Z jednej strony pozwala dopasować odpowiednią metodę do charakteru zgromadzonych danych. Z drugiej strony rodzi wątpliwości, która z metod jest najbardziej adekwatna w konkretnie analizowanym przypadku i czy zastosowanie wybranej metody na pewno jest w pełni uzasadnione. Autor rozprawy wykorzystał względnie zróżnicowane metody statystyczne, a ich dobór sprawia na mnie wrażenie ogólnie przemyślanego i logicznego. Liczę jednak na bezpośrednią dyskusję i możliwość wymiany poglądów dotyczących metody opisanej w pkt. 5.5.2. Szacowana tą

metodą frekwencja alleli heterozygotycznych oparta jest o model równowagi Hardy'ego-Weinberga, a w Przeglądzie piśmiennictwa na str. 11 autor informuje, że fasola zwyczajna jest rośliną jednoroczną samopylną. Model matematyczny struktury populacji Hardy'ego-Weinberga został opracowany dla populacji obcopolnych. Rodzi się tym samym temat do dyskusji: czy i w jakim zakresie użyta metoda daje informatywne wyniki?

Opis wyników został zamieszczony w rozdziale 6 podzielonym przez autora na szereg podrozdziałów. W tym rozdziale zastosowana struktura tekstu nie budzi moich zastrzeżeń – podrozdziały i wyróżnione w nich podpunkty ułożone są logicznie, dzięki czemu autor osiągnął zamierzony cel: czytelnik może łatwo odnaleźć, który z aspektów pracy jest opisany w konkretnym miejscu. Wydzielenie poszczególnych podrozdziałów jest tym bardziej uzasadnione, że opis wyników obejmuje względnie zróżnicowane zagadnienia. Wśród nich znajdują się kwestie związane z opracowaniem elementów metodycznych analiz na poziomie molekularnym oraz właściwe wyniki będące tematem pracy. Te ostatnie analizowane są w różnoraki sposób, z uwzględnieniem danych o pochodzeniu fizyko-geograficznym, oceną struktury genetycznej badanej kolekcji, wpływu różnych metod statystycznych, oceny fenotypowej i analiz molekularnych na wyniki grupowania badanych obiektów. W tytule podrozdziału 6.6 powraca problem zasugerowany przeze mnie przy charakteryzowaniu celów pracy: wykonana analiza wbrew tytułowi dotyczyła struktury genetycznej badanej kolekcji, a nie struktury odmian i populacji miejscowych (tytuł sugeruje, że oceniano wewnętrzną zmienność genetyczną w odmianach i populacjach, a to nie było przedmiotem badań). Opis wyników kończy podrozdział traktujący o proponowanej kolekcji podstawowej. Ten ostatni fragment tekstu budzi mój niedosyt – opis jest dość lakoniczny, trochę nieadekwatny do faktu, że autor postawił sobie wybór obiektów do utworzenia kolekcji podstawowej za jeden z czterech celów pracy. Niewątpliwie mocną stroną rozdziału dotyczącego wyników jest materiał dokumentacyjny: liczne przejrzyste zaprojektowane tabele i czytelne rysunki pomagają w zrozumieniu tego, czego autor nie opisał w sposób szczegółowy.

Dyskusja wyników jest przeprowadzona poprawnie i obejmuje najważniejsze zagadnienia. Moje uwagi do tego rozdziału mają głównie charakter dyskusyjny (raczej niczego istotnego nie wnoszą do aktualnej wersji pracy, ale może zainspirują mgra Nowosielskiego przy dalszych pracach naukowych). Na stronie 67 autor prowadzi rozważania nad zmiennością cech fenotypowych w latach poszukując wyjaśnienia w genotypach roślin, a tym czasem pomija prawie całkowicie wpływ środowiska. Takie czynniki środowiskowe jak ekstremalna susza przyspieszająca w pewnym konkretnym środowisku (roku/miejscowości) dojrzewanie nasion, które nie do końca zdążyły się wypełnić, może moim zdaniem też być wytłumaczeniem zmienności masy tysiąca nasion w zakresie 190-270g. Przy ocenie zróżnicowania genetycznego obiektów kolekcyjnych pan Nowosielski dokonał analizy możliwego wpływu presji selekcyjnej w określonych regionach geograficznych. Trochę zabrakło mi tutaj dodatkowej analizy historycznej. Co prawda nie widać w otrzymanych wynikach łatwego do interpretacji związku, ale fasola jest w Polsce gatunkiem introdukowanym w czasach historycznych, które obejmowały ponad stuletni podział naszego kraju pomiędzy trzech zaborców. Czas i miejsca skąd i dokąd były przemieszczane partie nasion populacji miejscowych fasoli mogą być nie mniej istotne dla obserwowanej zmienności, jak wpływ środowiska na selekcję genotypów (ten ostatni czynnik jest niewątpliwie ważny, ale jego działanie jest rozłożone w czasie i efekty mogą moim zdaniem nie być istotniejsze od czynnika historycznego).

Wnioski końcowe podsumowują uzyskane wyniki. Ich sformułowanie nie we wszystkich przypadkach ma charakter jednoznacznych wniosków (np. pkt.5: „Dwie pule moga odzwierciedlać...”). W takiej sytuacji często autorzy prac naukowych stosują tytuł „podsumowania i wnioski” lub ograniczają listę wniosków do mniej licznych punktów, których treść nie wymusza trybu warunkowego.

Dokonując oceny rozprawy doktorskiej pana mgra Jarosława Nowosielskiego nie mogę nie wspomnieć o pewnych niedociągnięciach o charakterze edytorskim. Tego rodzaju niedociągnięcia są typowe dla manuskryptów niepoddawanych profesjonalnym procesom wydawniczym, dlatego pominię w tej recenzji wszystkie drobne błędy drukarskie o charakterze tzw. „literówek” (tym bardziej, że znalazłem ich naprawdę niewiele). O kilku problemach muszę jednak wspomnieć, bo mam nadzieję, że pomoże to panu Nowosielskiemu w pisaniu przyszłych prac naukowych. Pierwszy problem edycyjny, który dostrzegłem to numeracja tabel i rysunków. Część z nich znajduje się w załącznikach na końcu pracy, a część jest wkomponowana w tekst. Ogólnie przyjęta jest zasada, że w pracy naukowej kolejne numery rysunków i tabel powinny się pojawiać sukcesywnie w tekście. Pan Nowosielski ponumerował tabele i rysunki zgodnie z kolejnością opisu w tekście, ale nie ma to związku z umiejscowieniem samego materiału dokumentacyjnego (czasami przywołana w tekście tabela jest gdzieś obok w tekście, ale czasami trzeba jej szukać w załączniku na końcu pracy). Autor starał się to uporządkować sygnalizując w tekście co jest w załącznikach, ale efekt końcowy odbiega od standardów dla prac naukowych, a na dodatek moje subiektywne wrażenia nie zawsze były pozytywne (gubiłem się szukając kolejnych tabel i rysunków). Sugerowałbym panu Nowosielskiemu na przyszłość odejście od tego rodzaju eksperymentów i zastosowanie metod tradycyjnie przyjętych przy redagowaniu prac naukowych. Tradycyjny model redagowania pracy daje autorowi kilka opcji do wyboru. Pierwsza możliwość (chyba najbliższa moim preferencjom) to rezygnacja z załącznika i przeniesienie wszystkich tabel i rysunków w tekst rozprawy. Tabele i rysunki ujęte w załączniku nie mają charakteru danych surowych (to często uzasadnia wprowadzenie załącznika do rozprawy), a są to głównie materiały zajmujące większą powierzchnię. Nie jest to jednak na tyle duża powierzchnia, aby nie można było ich umieścić w głównym tekście. Druga opcja, to przeniesienie wszystkich tabel i rysunków (nawet tych małych) do załączników. Nie jestem zwolennikiem takiego rozwiązania, gdyż wolę gdy opis wyników sąsiaduje z materiałem dokumentacyjnym, ale takie sformatowanie pracy nie budziłoby zastrzeżeń formalnych. Trzecie rozwiązanie to zastosowanie niezależnej numeracji dla materiałów ujętych w tekście głównym i w załącznikach (np. tabele w załączniku mogłyby mieć numery zaczynające się od Z1, Z2 itd.).

Druga uwaga edytorska dotyczy sposobu cytowania części prac naukowych. W kilku miejscach w pracy zdania informujące o dokonaniach autorów opublikowanych prac zostały tak zredagowane, że pierwszy autor (lub autorka) „coś opisał lub coś wykonał”, ale dalej przywołana jest publikacja wielu autorów. Przy pierwszym takim cytacie odniosłem wrażenie, że pan Nowosielski może tak dobrze znać szczegóły realizacji opisywanych badań, że miał podstawy aby przypisać pewne dokonania opisane w publikacji wielo-autorskiej jednej osobie. Ale gdy ten sposób redagowania zdań zaczął się powtarzać w pracy, nabrałem wątpliwości czy nie jest to tzw. maniera językowa, która stoi w sprzeczności z autentycznym wkładem autorów w cytowane wyniki prac badawczych.

Chciałbym też uczulić doktoranta na fakt, że pewne określenia zaczerpnięte z obcych języków, które są używane na co dzień w konkretnym laboratorium i zrozumiałe dla

członków zespołu badawczego, mogą wymagać bardziej szczegółowych wyjaśnień w tekście skierowanym do niezależnego czytelnika. Ta moja refleksja wynika z zastosowania w tekście pracy określenia „markery redundantne”. Zgodnie ze Słownikiem wyrazów obcych PWN redundantny to „funkcjonalnie niepotrzebny, nadmiarowy, zbędny”. Eliminacja takich „zbędnych” markerów, którą przeprowadził pan Nowosielski jest niewątpliwie uzasadniona, ale nigdzie w pracy nie znalazłem klarownego wyjaśnienia, dlaczego część markerów była w rzeczywistości funkcjonalnie niepotrzebna/zbędna. Wyjaśnienie tego wymaga nieco dokładniejszego opisu sposobu generowania markerów AFLP. Uzyskiwane produkty amplifikacji są inicjowane przez kombinacje starterów zakotwiczonych w sekwencjach rozpoznawanych przez dwa enzymy restrykcyjne, ale część amplikonów pochodzi z reakcji inicjowanych na obu końcach przez ten sam starter. Jeśli więc ten starter występował w różnych kombinacjach z innymi starterami, to niektóre markery otrzymane w czasie niezależnych eksperymentów mogły być zwykłymi duplikatami. Tym samym kilkakrotnie otrzymywano ten sam marker i należało ująć go w analizach statystycznych tylko jeden raz. Procedura eliminacji markerów redundantnych była więc jak najbardziej uzasadniona i świadczy o staraniach autora o rzetelność naukową wykonanych badań. Szkoda tylko, że ten fakt może pozostać niezrozumiały dla czytelnika, który nie jest zaznajomiony ze specyfiką metody AFLP.

Na koniec z obowiązku recenzenta muszę wspomnieć, że praca nie jest wolna od drobnych niedociągnięć edytorskich. Nie ma większego sensu wymienianie wszystkich, ale pozwolę sobie na dwa przykłady. Na początek cytuję z Wprowadzenia: „Światowy stan zasobów genetycznych rodzaju *Phaseolus* oceniany jest na 261963 obiekty i jest to czwarta co do wielkości kolekcja po pszenicy, ryżu, jęczmieniu i kukurydzy”. Jeśli są wymienione literalnie cztery gatunki o kolekcjach liczniejszych od fasoli, to rodzajowi *Phaseolus* trudno przypisywać czwartą pozycję. W Przeglądzie piśmiennictwa na stronach 10/11 oraz 18/19 widać wyraźnie, że autor składał maszynopis korzystając z różnych wersji plików (zauważalna jest różnica w czcionce na wydruku). Nie byłoby w tym nic złego, gdyby nie konsekwencja merytoryczna: na stronach 18/19 graniczny wers jest powtórzony (błąd wybaczalny), ale na stronach 10/11 czegoś ewidentnie w tekście brakuje – zdania na granicy obu stron utraciły swój sens.

Wspomnianych niedociągnięć edytorskich jest w pracy niewiele i tekst jest w pełni zrozumiały dla czytelnika. Zastosowane metody są adekwatne do postawionych celów pracy, dobór materiału poprawny, a opis i interpretacja wyników w pełni spełnia kryteria dla prac naukowych. Oceniana rozprawa spełnia wymagania ustawowe wobec prac doktorskich, w związku z czym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie o dopuszczenie pana magistra Jarosława Nowosielskiego do publicznej obrony doktoratu.

Stojałowski

Szczecin, 5.09.2020.

dr hab. inż. Stefan Stojałowski