

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Doroty Milczarek

pt. *Zastosowanie technik molekularnych w selekcji ziemniaka uprawnego odpornego na mątwiki (Globodera spp.)*

W przedstawionej do recenzji rozprawie Autorka opisała wyniki weryfikacji przydatności markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności ziemniaka na nicienie z gatunków *Globodera rostochiensis* i *G. pallida*. Analizowane markery zostały wybrane w oparciu o wcześniejsze doniesienia różnych autorów, a postulowane sprzężenia dotyczyły siedmiu genów odporności introdukowanych do genomu *Solanum tuberosum* z dzikich trzech gatunków: *S. tuberosum* subsp. *andigena*, *S. vernei* i *S. spegazzini*. Badania zawarte w pracy doktorskiej Pani mgr Doroty Milczarek miały na celu wskazanie markerów skutecznie selekcyjnych rośliny posiadające geny odporności, poprawę efektywności selekcji poprzez ocenę „dawki” genu odporności, ocenę wpływu selekcji wspomaganą markerami w kierunku odporności na mątwiki na poziom cech użytkowych oraz wyselekcjonowanie klonów ziemniaka o wysokiej i złożonej odporności na różne patotypy tego szkodnika. Autorka podjęła również udaną próbę opracowania metody równoległego genotypowania różnych *loci* w systemie multipleks-PCR. W pracy bardzo wyraźnie zaznaczony został jej aplikacyjny charakter, a przedstawione wyniki, poza ich niewątpliwą wartością poznawczą i użytkową, są w mojej opinii bardzo cenną ilustracją skali problemów związanych z adaptacją informatywnych markerów molekularnych dla konkretnych populacji niespokrewnionych bezpośrednio z tymi, dla których markery zostały oryginalnie wygenerowane. Moje uznanie wzbudził sposób w jaki eksperymenty zostały zaplanowane i wykonane, co pozwoliło jednoznacznie ocenić przydatność weryfikowanych markerów, mimo niesatysfakcjonujących (z punktu widzenia hodowli, ale merytorycznie poprawnych) wyników dotyczących oczekiwanych sprzężeń kilku z nich z odpowiednimi genami odporności.

Struktura pracy

Praca w formie monografii obejmuje 134 strony maszynopisu z wydzielonymi rozdziałami typowymi dla prac naukowych z zakresu nauk przyrodniczych.

Streszczenie w języku polskim i angielskim bardzo dobrze charakteryzuje założenia pracy i prezentuje uzyskane wyniki i wnioski.

Wstęp stanowi syntetyczne wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej i sygnalizuje wszystkie istotne zagadnienia, które stanowią podstawę przeprowadzonych badań.

Cel pracy został zwięźle i precyzyjnie sformułowany w formie czterech punktów poprzedzonych poprawnie zdefiniowaną hipotezą badawczą.

W przeglądzie literatury obejmującym 16 stron maszynopisu Autorka omówiła gromadę nicieni, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju *Globodera*, pod względem ich znaczenia dla produkcji rolniczej, klasyfikacji taksonomicznej, cyklu życiowego oraz interakcji patotypów z organizmami żywicielskimi w obrębie rodzaju *Solanum*. Szczegółowo scharakteryzowała ona również mechanizmy odporności roślin ziemniaka na mątwiki, wskazała możliwe do wykorzystania w hodowli ziemniaka źródła odporności na te agrofagi i pochodzące z tych źródeł geny warunkujące odporność. W bardzo interesujący sposób opisała ona również proces hodowli twórczej ziemniaka oraz korzyści, które związane są z wprowadzeniem do hodowli technik molekularnych, czyli prowadzenia tzw. selekcji wspomagananej markerami (ang. *marker assisted selection*, MAS). Ostatni podrozdział przeglądu literatury to charakterystyka technik identyfikacji markerów molekularnych stosowanych w ostatnich kilkudziesięciu latach do identyfikacji polimorfizmów sprzężonych z cechami ważnymi użytkowo. Zabrakło mi jednak w tym miejscu nawet krótkiego odniesienia do całej grupy technik wysokowydajnych, począwszy od technologii Diversity Arrays, a skończywszy na genotypowaniu SNP w oparciu o sekwencjonowanie następnej generacji.

Materiały i metody zostały opisane w sposób szczegółowy i kompletny. Bardzo dobrze zaprezentowany został wykorzystany w badaniach materiał roślinny. Schemat przedstawiony na Rys. 1 bardzo dobrze ilustruje strukturę przeprowadzonych eksperymentów. Metody zostały również zaprezentowane bardzo starannie, ale przy tak szczegółowej prezentacji nie udało się uniknąć pewnych rozbieżności, np. na str. 44 (3 wiersz od góry) wskazano, że oczekiwana wielkość produktu dla markera TG689 to 205 pz, podczas gdy w Tab. 9 podana jest wielkość 141 pz. Nie zostało również wystarczająco jasno opisane w jaki sposób przeprowadzono genotypowanie markerami SPUDI636 i HC, skoro są to polimorfizmy pojedynczego nukleotydu

(SNP, por. Tab. 9). Ponadto, produkt amplifikacji fragmentu genu BCII nie powinien być nazywany markerem (str. 40), gdyż nie identyfikuje on polimorfizmu.

Wyniki wraz z dokumentacją (24 tabele, 12 fotografii i 14 wykresów) obejmują 45 stron i stanowią zasadniczą część pracy. Otrzymane rezultaty badań są logicznie uporządkowane, czytelnie przedstawione i poparte właściwie dobranym materiałem ilustracyjnym. Obejmują one podrozdziały opisujące ocenę odporności roślin ziemniaka na mątwiki, analizy molekularne czyli genotypowanie w oparciu o pojedyncze markery oraz w układzie multipleks, a także próbę weryfikacji „dawki” genu przy użyciu techniki real time PCR, wreszcie ocenę cech agronomicznych w kontekście selekcji wspomaganą markerami w kierunku odporności na *Globodera*, pozwalającej na piramidyzację genów odporności.

Dyskusja obejmuje 16 stron i stanowi właściwe uzupełnienie i komentarz do sekcji opisującej wyniki przeprowadzonych eksperymentów, umieszczając je w szerszym kontekście. Podobnie jak pozostałe części rozprawy, została ona zorganizowana starannie i w przemyślany sposób. Moje drobne wątpliwości budzą stwierdzenia dotyczące „zbyt niskiej polimorficzności markerów” (str. 90) oraz ich „niewystarczającej polimorficzności” (str. 92) – myślę, że w tym wypadku lepiej byłoby mówić o braku sprzężenia pomiędzy określonymi markerami a cechą odporności w odniesieniu do analizowanych w badaniach populacji roślin.

Podsumowanie i wnioski to zbiór sześciu rozbudowanych punktów stanowiących na ogół poprawną rekapitulację wyników przeprowadzonych eksperymentów, jednak niektóre z nich ograniczają się jedynie do komunikatu na temat zakresu wykonanych prac (np. punkty 3a i 3b).

Spis literatury obejmuje 158 pozycji i trzy strony internetowe. Wykorzystany przez Autorkę zestaw publikacji świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia badań.

Na końcu pracy Autorka umieściła trzy dodatki zawierające tabele prezentujące warunki pogodowe w trakcie doświadczeń polowych, nawożenie stosowane w tych doświadczeniach oraz szczegółowe wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych.

Merytoryczna ocena pracy

Dysertacja przygotowana przez Panią mgr Dorotę Milczarek dotyczy poważnego problemu związanego z uprawą ziemniaka, jakim są straty plonu wywoływane przez porażenie mątwikami. Ziemniak jest jednym z najważniejszych gatunków roślin uprawnych zarówno na

świecie, jak i w Polsce. Ograniczanie strat związanych z występowaniem matwików jest możliwe głównie dzięki wykorzystaniu odmian odpornych: ochrona chemiczna jest mało wydajna i wymaga zastosowania środków o wysokiej szkodliwości dla środowiska. Hodowla twórcza ziemniaka wymaga zatem jednoczesnej selekcji na wiele cech użytkowych, w powiązaniu z selekcją w kierunku odporności na nicienie. Hodowla odpornościowa może zostać usprawniona poprzez wykorzystanie metod molekularnych w procesie zwanym selekcją wspomaganą markerami. Jednak aby była ona skuteczna, niezbędne jest opracowanie zestawu markerów molekularnych, które w selekcionowanych materiałach roślinnych wykazywałyby będą zadowalający poziom sprzężenia genetycznego z genem lub genami warunkującymi cechę odporności. W odniesieniu do odporności na *Globodera* istnieje stosunkowo wiele doniesień literaturowych na temat markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi odporność na różne patotypy *G. rostochiensis* i *G. pallida*. Te informacje stanowiły punkt wyjścia do przeprowadzonych przez Autorkę badań mających na celu weryfikację skuteczności tych markerów w puli materiałów hodowlanych ziemniaka, opracowanie wydajnej technologii genotypowania, ocenę „dawki” genu, ocenę wpływu selekcji wspomaganą markerami w kierunku odporności na inne cechy użytkowe oraz otrzymanie klonów o złożonej odporności warunkowanej kilkoma różnymi genami.

W wyniku szeroko zakrojonych eksperymentów Autorka wskazała markery, które w analizowanej puli materiałów hodowlanych ziemniaka cechowały się wystarczającym poziomem sprzężenia z odpowiednim genem odporności i zostały uznane za dobre narzędzia diagnostyczne. Wskazała również grupę markerów, dla których sprzężenie to nie było obserwowane. W odniesieniu do informatywnych markerów udało się opracować warunki reakcji multipleks PCR pozwalające na jednoczesne genotypowanie dwóch loci. Analiza segregacji pozwoliła wskazać rośliny zawierające jedną lub dwie kopie genu *HI*, ale niestety próba wykorzystania w tym celu metody real time PCR zakończyła się niepowodzeniem. Cenną obserwacją było to, że nie stwierdzono negatywnych związków pomiędzy obecnością genów warunkujących odporność na nicienie a cechami agronomicznymi ziemniaka. Efektem praktycznym pracy było wyprowadzenie 14 klonów ziemniaka o wysokiej złożonej odporności na wszystkie patotypy *Globodera*, które cechowały się również wysoką jakością, a nawet miały bulwy istotnie większe od rodów podatnych.

Podsumowanie

Przedstawioną mi do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Wskazuje ona na bardzo dobry poziom przygotowania Autorki do prowadzenia badań z zakresu hodowli twórczej roślin, łączącej metody typowe dla hodowli konwencjonalnej z wiedzą dotyczącą wykorzystania analiz molekularnych do wspomagania selekcji. Podjęta przez Autorkę tematyka posiada przede wszystkim duże znaczenie aplikacyjne; duża część pracy stanowi jednocześnie demonstrację możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych wyników w hodowli twórczej ziemniaka.

Oceniana dysertacja spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. W szczególności stanowi ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr Doroty Milezarek w dziedzinie nauk rolniczych i dyscyplinie agronomii oraz jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuję zatem do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie Pani mgr Doroty Milezarek do dalszych etapów procedury doktoranckiej. Wysoka ocena zawartości merytorycznej rozprawy pozwala mi również na postawienie wniosku o wyróżnienie pracy.



Kraków, 6 lipca 2016

prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus