

Warszawa, 29.08.2022

dr hab. Hanna Bolibok-Brągoszewska, prof. SGGW
Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Instytut Biologii
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Joanny Dziurdziak pt. "Charakterystyka zmienności genetycznej wybranych obiektów *Hordeum vulgare* L.

Rozprawa doktorska mgr **Joanny Dziurdziak** stanowi cykl trzech artykułów naukowych opublikowanych w latach 2020 – 2022 i opatrzonych opisem.

Trzy prace naukowe wchodzące w skład opracowania to spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wartości współczynnika wpływu (Impact Factor, IF) dla tych czasopism (wg roku publikacji artykułu) wahają się od 3,417 do 6,208; sumaryczny IF wynosi 13,574, a suma cytowań w bazie Web of Science Core Collection wynosi 4, bez autocytowań 1 (stan z dnia 26.08.2022). Należy zauważyć, że publikacje te ukazały się bardzo niedawno i w najbliższych latach liczba cytowań zapewne wzrośnie. Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy są wieloautorskie. Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich prac. Według oświadczeń udziały w powstaniu prac wkład Doktorantki był bardzo duży i jednoznacznie wiodący - obejmował udział w wytypowaniu obiektów do badań, wykonanie lub współudział w wykonaniu zdecydowanej większości analiz (takich jak: izolacja DNA, analiza ISSR, analiza danych genetycznych, analiza danych morfometrycznych), przygotowanie rycin, przygotowanie i korektę manuskryptów oraz, w przypadku trzeciej publikacji, również współpracę przy opracowaniu koncepcji pracy. Oświadczenia pozostałych współautorów o ich udziały w powstaniu prac są zgodne z treścią oświadczeń Doktorantki. Treść oświadczeń Doktorantki pozostałych współautorów jest także zgodna z wkładem deklarowanym w samych publikacjach, chociaż opis tego w wkładzie w treści publikacji jest bardzo ogólnikowy.

Opis poprzedzający cykl publikacji, liczący 39 stron, obejmuje następujące elementy: Streszczenie (w jęz. polskim i angielskim), Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz skrótów, Wprowadzenie, Hipotezy badawcze i cele pracy, Materiały i metody, Omówienie wyników, Wnioski, Spis literatury. Badania zostały zrealizowane w ramach Programu

Wieloletniego 2015-2020 „Stworzenie naukowej podstawy postępu biologicznego i zachowanie zasobów genowych roślin jako źródła innowacji wspierających zrównoważone rolnictwo i bezpieczeństwo żywnościowe kraju” finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych (KCRZG), Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie, natomiast część obliczeniowa analizy danych została wykonana w Interdyscyplinarnym Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego UW w ramach Grantu Obliczeniowego nr G72-19. Promotorem pracy była dr. hab. Maja Boczkowska, prof. Instytutu, a promotorem pomocniczym – dr Małgorzata Targońska Karasek (Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie).

Tematyka badań opisanych w rozprawie dotyczy charakterystyki zróżnicowania genetycznego obiektów jęczmienia zwyczajnego z kolekcji Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie, głównie odmian miejscowych i odmian historycznych, przy pomocy markerów molekularnych typu DArTseq i ISSR oraz, częściowo, z wykorzystaniem pomiarów ziarniaków i historycznych danych z doświadczeń polowych. Jest to bardzo aktualna tematyka badawcza, związana z rosnącą świadomością na temat potencjału zasobów genowych jako źródła naturalnych wariantów genów, które mogą zostać wykorzystane w hodowli dla tworzenia nowych odmian roślin uprawnych, na przykład lepiej przystosowanych do ekstremalnych warunków klimatycznych, z którymi coraz częściej musimy się zmagać – wysokich temperatur i suszy, czy też osiągających wyższe plony na słabych glebach. Jedną z podstawowych przeszkód, utrudniających praktyczne wykorzystanie zasobów banków genów jest brak informacji dotyczących zakresu reprezentowanej przez nie zmienności, zarówno pod względem cech morfologicznych, jak i na poziomie genomu.

Tytuł rozprawy został sformułowany właściwie i dobrze oddaje tematykę przeprowadzonych badań.

W moim odczuciu streszczenie jest zbyt ogólnikowe, zbyt duża jego część (połowa) została poświęcona opisowi kolekcji KCRZG, której w pracy charakteryzowano przecież jedynie niewielką część, natomiast zbyt skrótowo przedstawiono metodykę (nie wymieniono nawet wykorzystanych metod) i wyniki.

Opis cyklu publikacji rozpoczyna się od „Wprowadzenia”, w którym Doktorantka przedstawiła skrótowo charakterystykę rodzaju *Hordeum*, i informacje o kolekcjach obiektów tego rodzaju (*Hordeum*) w bankach genów, głównie o kolekcji jęczmienia jarego w KCRZG. W dalszej części wprowadzenia Doktorantka definiuje odmiany miejscowe i opisuje ich potencjał w hodowli oraz odmiany hodowlane i wymienia podstawowe metody wykorzystywane w hodowli.

Wprowadzenie kończy się informacjami na temat technik molekularnych stosowanych w badaniach zróżnicowania genetycznego jęczmienia. Moim zdaniem w rozdziale tym brakuje informacji o wynikach dotychczasowych analiz zróżnicowania genetycznego jęczmienia, na przykład: jakie cechy wpływają na strukturę populacji, czy zaobserwowano powiązanie struktury zróżnicowania genetycznego z pochodzeniem geograficznym, czy zaobserwowano spadek zmienności genetycznej w odmianach współczesnych. W mojej ocenie warto było się pokusić o takie podsumowanie, byłoby ono odpowiednim tłem dla opisu uzyskanych przez Doktorantkę wyników i ułatwiło ocenę ich wartości, zwłaszcza, że dostępne są wyniki bardzo obszernych i kompleksowych analiz zróżnicowania jęczmienia, np. wyniki charakterystyki całej kolekcji z banku genów IPK W Gatersleben w Niemczech (w sumie ponad 22 tysiące zbadanych obiektów, Milner i wsp. 2018), czy też wyniki charakterystyki kolekcji rdzeniowej jęczmienia USDA liczącej ponad 2400 obiektów (Muñoz-Amatriaín i wsp. 2014).

Ostatnią częścią Wprowadzenia jest Podsumowanie. Duża jego część poświęcona jest koncepcji kolekcji podstawowej/kolekcji rdzeniowej (ang. *core collection*). Uważam, że właściwsze byłoby poświęcenie temu zagadnieniu odrębnego podrozdziału we Wprowadzeniu zwłaszcza, że typowanie obiektów do kolekcji rdzeniowej jest elementem jednej z publikacji składających się na rozprawę doktorską.

W opisie pracy doktorskiej przedstawionych zostało sześć hipotez badawczych, oraz dwa cele główne pracy i siedem celów szczegółowych. Wymienione cele nawiązują do celów naukowych poszczególnych prac z cyklu, potwierdzając jego spójny charakter. Jako czytelnik odczułam niedosyt w związku z brakiem nawiązania w części pracy Wprowadzenie dla części zagadnień poruszonych w Hipotezach badawczych. Uwaga ta wiąże się z wcześniejszą moją uwagą dotyczącą braku podsumowania dotychczasowych wyników analiz zróżnicowania genetycznego jęczmienia i dotyczy zwłaszcza hipotez nr 2 i nr 6.

Moje zastrzeżenia budzi również drugi cel główny pracy: „Podniesienie świadomości społeczności naukowców i hodowców w zakresie potencjału zgromadzonej kolekcji obiektów jęczmienia jarego i zwiększenie zainteresowania wykorzystaniem zasobów genowych w pracach i rozwojowych”. Cel ten, mimo że problem sam w sobie jest jak najbardziej godny uwagi, nie jest w moim odczuciu celem naukowym. Jakiego sposobu przyjęto do weryfikacji czy cel ten został osiągnięty? Cele szczegółowe zostały sformułowane właściwie, są istotne poznawczo i mają znaczenie praktyczne, gdyż ich realizacja może dostarczyć informacji użytecznych przy wyborze materiałów do hodowli twórczej i badań naukowych, np. nad genetycznymi podstawami odporności na wybrane choroby jęczmienia.

W rozdziale Materiały i metody wymieniono zbiorczo grupy obiektów zbadanych w poszczególnych publikacjach (odmiany miejscowe zebrane w trakcie ekspedycji na terenie Polski,

odmiany miejscowe z różnych rejonów geograficznych, polskie odmiany hodowlane). Następnie wypunktowane zostały metody laboratoryjne i analizy danych wraz z krótkim opisem. Osobno podane zostały również informacje o programach wykorzystanych w analizie danych. Na podstawie tych informacji wnioskuję, iż Doktorantka dobrze opanowała podstawowe techniki laboratoryjne i z sukcesem zastosowała szeroki wachlarz metod statystycznych i biostatystycznych. Metody te są dobrze dobrane do wyznaczonych celów badawczych i powszechnie uznane jako właściwe w tego typu analizach.

Kolejny rozdział zawiera skrótowy opis wyników zwartych w poszczególnych publikacjach z cyklu.

Pierwszy artykuł, opublikowany w roku 2020 w czasopiśmie wydawnictwa MDPI *Agronomy* (10: 1958), dotyczy charakterystyki zróżnicowania genetycznego 64 odmian miejscowych jęczmienia zebranych na terenie Polski południowej i południowo-wschodniej w trakcie ekspedycji w latach 60-tych i 70-tych ubiegłego wieku. Spośród badanych obiektów 18% stanowiły formy 6-cio rzędowe. Do badań zróżnicowania genetycznego wykorzystano markery ISSR. Zastanawiam się, czym był podyktowany wybór tych właśnie markerów, spośród wszystkich innych dostępnych dla jęczmienia, zwłaszcza w niecodziennym ujęciu analitycznym, wykorzystującym sekwenatory kapilarne do analizy produktów amplifikacji. Proszę Doktorantkę o odpowiedź na to pytanie w trakcie publicznej obrony. W pracy wykorzystano również dane paszportowe, dane historyczne z doświadczeń polowych oraz pomiary ziarniaków. Ww. dane zostały szczegółowo i wszechstronnie przeanalizowane przy pomocy zróżnicowanych metod biostatystycznych, takich jak analiza wariancji molekularnej, analiza głównych współrzędnych, metoda bayesowska do uzyskania informacji o strukturze populacji, ANOVA, i inne. Uzyskane wyniki zostały bardzo szczegółowo opisane i przedyskutowane. Publikacja zawiera również wiele rycin prezentujących graficznie wyniki. Ułatwiają one odbiór pracy i dostrzeżenie opisywanych zależności w badanym zestawie obiektów. Przeprowadzone analizy (głównie PCoA i Structure) pozwoliły na wyodrębnienie wśród badanych odmian miejscowych 3 grup i wskazanie powiązania struktury z taksonomią (badane obiekty reprezentowały 6 odmian botanicznych) i cechą morfologiczną – oplewieniem nasion. Stwierdzono również występowanie w kolekcji ważnych cech użytkowych takich jak zimnotrwałość czy odporność na patogeny, zatem badane w omawianej pracy odmiany mogłyby być cennym materiałem do badań podstawowych lub prac hodowlanych. Dokładniejsze określenie tego potencjału praktycznego jest utrudnione. W badaniach nie uwzględniono bowiem odmian współczesnych jęczmienia, stąd nie można wnioskować, czy charakteryzowane w pracy odmiany miejscowe reprezentują odrębną pulę genową i czy są potencjalnym źródłem alleli genów odporności innych niż te wykorzystywane współcześnie w hodowli jęczmienia. Chciałabym pokreślić, że Autorzy skrupulatnie wymienili i

przedyskutowali w Dyskusji to i inne potencjalnie ograniczenia przyjętego układu doświadczalnego, który często jest przecież kompromisem między marzeniami i ambicjami badacza a szarą rzeczywistością niewielkiego finansowania i innych ograniczeń.

Drugi artykuł, opublikowany w roku 2021, również w piśmie *Agronomy* (11:2330), zawiera wyniki charakterystyki zróżnicowania genetycznego 116 odmian miejscowych jęczmienia z kolekcji KCRZG, reprezentujących różne rejony geograficzne: Polskę, obszary dawnego Związku Radzieckiego i Czechosłowacji, Gruzję, Iran i Litwę. Tym razem do genotypowania wykorzystano jedną z obecnie najbardziej popularnych i nowoczesnych metod wykrywania różnic w sekwencji DNA - genotypowanie przez sekwencjonowanie (w wariacie DArTseq). Podobnie jak w poprzedniej pracy, wykorzystano dane z historycznych obserwacji polowych oraz pomiary ziarniaków, wykonane na potrzeby tego projektu, oraz bardzo szeroki wachlarz metod analizy danych. Wykazano istnienie struktury w badanej kolekcji i wyodrębniono w niej dwie lub trzy podgrupy (w zależności od zastosowanej metody). Wskazano, że pochodzenie geograficzne do pewnego stopnia wpływa na strukturę zróżnicowania genetycznego, a szczególnie odrębne genetycznie są odmiany miejscowe z Iranu. Zaobserwowano również duże zróżnicowanie genetyczne odmian miejscowych z Polski. Podobnie jak w poprzedniej pracy główną determinantą struktury populacji w badanym zestawie obiektów okazało się oplewienie ziarniaków (lub jego brak). Przeprowadzono również porównanie wyników analiz bazujących na genotypowaniu ISSR i DArTseq. Nie udało mi się znaleźć w samej publikacji ani w opisie informacji o tym ile obiektów zostało przebadanych oboma ww. metodami molekularnymi. Nie znalazłam również informacji o tym ile w zestawie było odmian o kłosach dwu- a ile o kłosach sześciorzędowych. Proszę o uzupełnienie tych informacji w trakcie publicznej obrony.

Ostatnia praca z cyklu, opublikowana w roku 2022 w czasopiśmie wydawnictwa MDPI *International Journal of Molecular Sciences* (23:4553), opisuje również wykorzystanie techniki DArTseq, tym razem do analizy zróżnicowania genetycznego w 83 obiektach - odmianach jęczmienia jarego reprezentujących ponad 120 lat polskiej hodowli tego zboża. Na podstawie ponad 11 tys. markerów SNP przeprowadzono bardzo obszerną i wnikliwą analizę zróżnicowania genetycznego, obejmującą również dystrybucję polimorficznych miejsc wzdłuż chromosomów i identyfikację alleli unikalnych dla grup odmian reprezentujących poszczególne okresy historyczne. Uzyskano niezwykle ciekawe i cenne informacje o zmianach puli genowej, heterogenności obiektów i poziomie zróżnicowania genetycznego, a także wskazano potencjalne duplikaty i wytypowano obiekty do kolekcji rdzeniowej. Uzyskane informacje są niezwykle użyteczne dla właściwego i efektywnego spełniania funkcji statutowych banku genów - zachowywania zmienności. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo wnikliwa i szczegółowa dyskusja uzyskanych wyników zawarta w tej pracy.

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągniętych zostało przez panią mgr Joannę Dziurdziak 9 wniosków, przedstawionych na stronie 36 opisu. Moim zdaniem lepszym tytułem dla tej części opisu byłoby „Podsumowanie”, ze względu na to, że niektóre sformułowania mają raczej charakter podsumowania (np. wniosek nr 6) lub postulatu (wniosek nr 9), niż wniosku. W moim odczuciu treść tej części pracy należało by sformułować z większą starannością.

Moje wątpliwości budzi m. in. treść wniosku nr 1. „Poziom zróżnicowania genetycznego kolekcji polskich odmian miejscowych jęczmienia jarego jest porównywalny z tym obserwowanym w innych krajowych kolekcjach odmian miejscowych zbóż. Czy uzyskane przez Doktorantkę wyniki umożliwiają przeprowadzenie takiego porównania?”

Chciałabym również zapytać Doktorantkę, czy zastosowany przez nią układ eksperymentalny w istocie uzasadnia sformułowanie tak kategorycznego twierdzenia, jakie zawarte zostało we wniosku nr 4: „Odmiany miejscowe o wielorzędowym kłosie nie wykazują odrębności genetycznej od form o kłosie dwurzędowym”.

Ostatnim elementem opisu cyklu publikacji jest Spis Literatury obejmujący 99 pozycji, w zdecydowanej większości oryginalnych angielskojęzycznych publikacji naukowych opublikowanych w uznanych czasopismach. Według mojej oceny wybór źródeł mógł być bardziej selektywny, zwłaszcza, że w przypadku części prac Doktorantka nie odwołuje się do uzyskanych wyników, a podaje je jedynie jako liczne przykłady zastosowania danej metody, np. wymienia 17 prac, w których do badań zróżnicowania genetycznego jęczmienia wykorzystano sekwencjonowanie nowej generacji, nie unikając przy tym pomyłek – praca Wenzla i wsp. z roku 2004 nie opisuje wyników zastosowania genotypowania przez sekwencjonowanie, autorzy zastosowali technikę mikromacierzową – Diversity Arrays Technology (DArT). W spisie literatury występują również usterki edycyjne – np. podanie tytułu w języku polskim dla publikacji o numerach 59 i 60 i 77, mimo iż są to publikacje napisane w języku angielskim.

Z obowiązku recenzenta wspomnę również o innych usterekach opisu: na przykład w Wykazie skrótów zastosowano pisownię każdego członu polskiego rozwinięcia skrótu wielką literą, co nie jest poprawne. W pracy występują również drobne usterki interpunkcyjne i stylistyczne, oraz skróty myślowe - proszę o wyjaśnienie informacji ze strony 21: „Kolekcje plazmy zarodkowej jęczmienia są coraz dokładniej charakteryzowane poprzez badania asocjacyjne całego genomu, a zidentyfikowaną zmienność można powiązać między innymi ze składaniem sekwencji jęczmienia”.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem problemu, ma dużą wartość poznawczą i potencjał aplikacyjny. Powiększa znacznie wiedzę o zróżnicowaniu genetycznym i determinantach struktury populacji jęczmienia, zwłaszcza polskich odmian

miejscowych i odmian hodowlanych tego gatunku. Uzyskane wyniki mają duże znaczenie praktyczne. Mogą bezpośrednio przyczynić się do zwieszenia efektywności zarządzania kolekcją KCRZG oraz do zwiększenia wykorzystania zasobów banku genów przez naukowców i hodowców. Uważam, że przedstawiona praca doktorska pani mgr Joanny Dziurdziak spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami, i wnioskuję o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Hanna Bolibok-Brągoszewska, prof. SGGW