



**INSTYTUT FIZJOLOGII ROŚLIN**  
*im. Franciszka Górskiego*  
**POLSKIEJ AKADEMII NAUK**  
**POLISH ACADEMY OF SCIENCES**  
*The Franciszek Górski*  
**INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY**

dr hab. Ilona Czyczyło-Mysza, prof. IFR PAN  
Instytut Fizjologii Roślin  
Polska Akademia Nauk  
ul. Niezapominajek 21  
30-239 Kraków

Kraków, 04.01.2023

**RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Joanny Wolko pt.: „Fenotypowa i genotypowa analiza efektu heterozji w mieszańcach rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)” wykonanej w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.**

Promotor: dr hab. Alina Liersch.

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Łopatyńska

**UZASADNIENIE WYKONANIA RECENZJI**

Uchwałą nr 1/XX61 Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie, podjętą w dniu 14 października 2022 r. w sprawie: wyznaczenia recenzentów rozprawy doktorskiej, na podstawie art. 29 ust. 2 pkt 14 ustawy z 30 kwietnia 2010 r. o instytutach badawczych (Dz. U. z 2022r., poz.498), zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r.) poz. 1669) oraz ustawą z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789) i Regulaminem Rady Naukowej z 12 października 2017 r. z późn. zm. - postanowiono o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej pani mgr Joanny Wolko, o czym powiadomił mnie stosownym pismem Prof. dr hab. Marek Stefan Szyndel – Przewodniczący Rady Naukowej (wpłynęło do IFR PAN w dniu 7. XI. 2022 r.).

## OCENA ZASADNOŚCI WYBORU TEMATU ROZPRAWY

Rzepak ozimy (*Brassica napus* L.) jest jedną z najważniejszych gospodarczo roślin oleistych uprawianych w Polsce i na świecie. Hodowla tej rośliny, na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat, bardzo się zmieniała i ciągle staje przed różnymi wyzwaniami. Jednym z najważniejszych zadań hodowli jest zapewnienie wysokiego i stabilnego plonowania roślin uprawnych w zmieniających się warunkach środowiskowych. Ze względu na stale rosnące zapotrzebowanie na olej rzepakowy do zastosowań spożywczych i niespożywczych w ostatnich latach, coraz większego znaczenia nabiera produkcja odmian mieszańcowych o wyższych plonach nasion i oleju. Dynamizm procesu hodowli rzepaku ozimego wprowadza jednak konieczność korekty w programach hodowlanych. Obecnie w rejestrze odmian dominują odmiany mieszańcowe, które pozwalają na wykorzystanie efektu heterozji. Wynika to m.in. z faktu, że wiele firm hodowlano-nasiennych, zintensyfikowało swoje prace nad tego typu odmianami. Badania nad poprawą plenności rzepaku metodą heterozji są od lat prowadzone, niemniej jednak nie do końca mechanizm ten został zbadany. **W związku z powyższym, stwierdzam, że Doktorantka podjęła badania ważne i istotne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego (gospodarczego) punktu widzenia.**

## OCENA FORMALNA ROZPRAWY

Ocenę merytoryczną rozprawy ułatwia to, że prezentowane **w dysertacji wyniki zamieszczone są w cyklu czterech spójnych tematycznie, anglojęzycznych, wieloautorskich publikacji**, które ukazały się w latach: 2016, 2019, 2021 i 2022. Zostały one poddane skrupulatnej ocenie niezależnych recenzentów. Trzy prace opublikowano w czasopismach o wysokich współczynnikach oddziaływania (ang. *impact factor*, IF) wynoszących od 2,185 do 3,949 (łącznie  $IF_{2021}=10,083$ ; 5-letni  $IF_{2021}=10,621$ ; sumaryczna liczba punktów MNiSW i MEiN (od 2021 roku) = 277). Według bazy Web of Science (dostęp 2022.12.28) prace z 2019 i 2021 roku były już cytowane odpowiednio 10 i 3 razy, co świadczy o aktualności problematyki badawczej podjętej przez Doktorantkę i zainteresowaniu jakim się one cieszą. Ostatnia praca ukazała się w czerwcu 2022 roku i nie ma jeszcze cytacji. W publikacji drugiej i czwartej Pani Wolko jest pierwszym autorem, natomiast w trzeciej autorem korespondencyjnym. Według oświadczeń dołączonych przez wszystkich współautorów, wkład Doktorantki w powstanie czterech powyższych publikacji został oszacowany odpowiednio na 45, 43, 43 i 45%. Kilkuosobowy zespół przy realizacji bardzo pracochłonnych i ambitnych zadań jest rzeczą naturalną i oczywistą w przypadku nauk rolniczych. Z przedłożonych oświadczeń, do publikacji I-IV, można wyodrębnić, rzeczywiste działania zrealizowane przez Doktorantkę, która brała udział w tworzeniu koncepcji i planowaniu badań, ich

realizacji, analizie, interpretacji i dyskusji wyników oraz w przygotowaniu i korekcie w/w manuskryptów, co wskazuje na jej znaczący udział zarówno w prowadzonych badaniach jak również w powstawaniu końcowej wersji artykułów. **Jest to niewątpliwie znaczący dorobek naukowy, osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora.**

Rozprawa doktorska Pani mgr Joanny Wolko, oprócz oświadczenia promotora i autora rozprawy doktorskiej, informacji o finansowaniu badań w ramach tematów statutowych (w jednym z nich Doktorantka była kierownikiem tematu statutowego młodego naukowca), podziękowań, oraz wykazu skrótów składa się z jedenastu rozdziałów. Są to: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenia w języku polskim i angielskim, przegląd literatury, hipotezy badawcze i cel badań, materiał i metody, omówienie wyników, podsumowanie uzyskanych wyników, wnioski, spis literatury, publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej będące podstawą osiągnięcia oraz oświadczenia dotyczące udziału kandydata i współautorów w przygotowanej publikacji. Całość dysertacji jest staranna, a jej układ klarowny i zgodny z wymogami formalnymi edycji rozpraw doktorskich.

## **OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Dysertacja Doktorantki składa się z jedenastu zasadniczych rozdziałów. Pierwszy z nich przedstawia wykaz publikacji wchodzący w skład rozprawy doktorskiej. Rozdział III (Przegląd literatury) poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim. Przegląd literatury wskazuje na bardzo dobrą znajomość badanego gatunku. W rozdziale tym Autorka prezentuje pochodzenie i osiągnięcia w hodowli rzepaku jako rośliny użytkowej. Następnie przedstawia najważniejsze cele i kierunki upraw w Polsce. Dalej omawia szczegółowo hodowlę odmian mieszańcowych rzepaku ozimego, a w ostatnim podrozdziale tej części porusza temat zastosowania markerów molekularnych wspomagających hodowlę tego gatunku.

W kolejnym, IV rozdziale Autorka przedstawiła trzy hipotezy badawcze, jeden cel naukowy i sześć celów szczegółowych. Cele i hipotezy sformułowano w sposób jasny i prawidłowy, aczkolwiek pierwsza hipoteza jest dość oczywista.

Materiał i metody wykorzystane w badaniach Doktorantka opisała szczegółowo w rozdziale V. Badania prowadzono na 182 genotypach rzepaku ozimego [60 liniach podwojonych haploidów (DH), 60 mieszańcach pojedynczych (CMS×DH), 60 mieszańcach trójliniowych (CMS/DH×*Rfo*) oraz liniach rodzicielskich 324/2 i 622/3, które posłużyły do wytworzenia populacji linii DH, a także linii męskosterylnej CMS ogura i linii z genem restorerem *Rfo*, których użyto do otrzymania

dwóch pokoleń mieszańców]. Wykorzystane podczas realizacji pracy metody oraz analizy molekularne i statystyczne są poprawne i nie budzą zastrzeżeń merytorycznych. Badania, które przeprowadziła Doktorantka można uznać za kompleksowe. Przy powstawaniu tak ważnego materiału roślinnego należy zwrócić uwagę na towarzyszącą mu pracochłonność podejmowanych działań, w których Pani mgr Joanna Wolko brała udział, jak również na wysoką pracochłonność zastosowanych w/w analiz, które umożliwiły zrealizowanie postawionych celów badań.

Rozdział VI prezentuje omówienie wyników przedstawionych w publikacjach uwzględnionych w dysertacji, które były już ocenione przez międzynarodowych recenzentów. Każde omówienie wyników w poszczególnych publikacjach poprzedzono bardzo krótkim wstępem, celem i metodyką jaka została zastosowana w danym manuskrypcie.

W pracy pierwszej wykazano dużą zmienność badanych grup rzepaku (60 linii DH, 60 mieszańców CMS×DH, 60 mieszańców CMS/DH×*Rfo*, linii CMS ogura i linii *Rfo*) pod względem 8 badanych cech fenotypowych. Przedstawione wyniki potwierdziły słuszność zastosowanego doboru materiału do badań w celu uzyskania odpowiedzi na postawione w dysertacji hipotezy i cele badawcze.

Badania opisane w drugiej publikacji (Wolko i wsp. 2019) były rozszerzeniem i kontynuacją badań opisanych w pierwszym artykule. Poszerzono je o wyniki doświadczenia polowego w kolejnym sezonie wegetacyjnym oraz o dodatkowe analizy. Oceniono efekt heterozji u mieszańców pojedynczych i trójliniowych rzepaku ozimego pod względem sześciu badanych cech fenotypowych jak: wysokość roślin, liczba rozgałęzień i liczba łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyńce, masa tysiąca nasion. Badania powtórzono w dwóch latach, co jest bardzo ważne w badaniach dotyczących stabilności plonowania. Stwierdzono pozytywny efekt heterozji dla wielu mieszańców niezależnie od pokolenia i roku doświadczenia polowego dla wysokości roślin, długości łuszczyń i liczby nasion w łuszczyńce. Obserwowany efekt był wyższy u mieszańców trójliniowych (niezależnie od sposobu jego wyliczenia), niż u pojedynczych. Wykazano, że środowisko jest głównym czynnikiem określającym ekspresję genów badanych cech i kształtowanie fenotypu.

Głównym celem trzeciej prezentowanej publikacji (Łopatyńska i wsp. 2021) było zastosowanie innego podejścia do interpretacji danych, jakie uzyskano w poprzednich latach i opracowano w omówionych już dwóch pierwszych publikacjach dysertacji. Doktorantka zastosowała tutaj statystyczne metody wielowymiarowe takie jak analiza głównych składowych czy analiza zmiennych kanonicznych, które pozwalają na porównanie wielu cech równocześnie. Potwierdzono wysokie zróżnicowanie w obrębie genotypów jak i między grupami obiektów. Wykazano, że

zmiennosć badanych genotypów pod względem konkretnych cech fenotypowych jest konieczna do ich mapowania oraz identyfikacji markerów molekularnych z nimi powiązanych.

Badania opisane w czwartej z cyklu publikacji (Wolko i wsp. 2022) są bardzo ważnym dopełnieniem badań przedstawionych w trzech pierwszych tekstach. W badaniach 89 markerów SSR, uzyskano 43 markery wykazujące istotne asocjacje z cechami powiązanych z plonem oraz z heterozją dla tych cech. Do mapowania fizycznego wybrano 15 markerów SSR: osiem powiązanych z badanymi cechami i dziewięć z efektem heterozji (część z nich się powtarzała). Wytypowano 6 markerów (BrGMS3837, BnEMS1119, BrGMS2901, BnGMS0509, BrGMS3688, BrGMS4057) powiązanych z genami odpowiedzialnymi za rozwój i wzrost roślin. Wszystkie miały pozytywny znak estymacji, wykazywały stabilność, a wyliczone wartości współczynnika informacji o polimorfizmie (PIC) wskazywały na ich wysoką informatywność i przydatność do oceny polimorfizmu badanych genotypów. Mapowanie fizyczne pozwoliło na wytypowanie genów kandydujących związanych z rozwojem roślin. Analizy przeprowadzone w tym doświadczeniu pozwoliły wytypować markery molekularne potencjalnie przydatne w MAS (ang. *Marker Assisted Selection*).

VII rozdział stanowi podsumowanie uzyskanych wyników, a w rozdziale VIII, na podstawie przeprowadzonych badań i analiz, przedstawiono siedem wniosków, które mają potwierdzenie w przedstawionej dokumentacji wyników i odniesienie do wcześniej sformułowanych hipotez. W rozdziałach VI-VIII jest wiele powtórzonych treści, natomiast – choć nie jest to obligatoryjne - brakuje mi w dysertacji ogólnej dyskusji łączącej wszystkie cztery publikacje. Doktorantka dokonała trafnego doboru cennych pozycji bibliograficznych dotyczących podjętego przez nią tematu rozprawy doktorskiej. Dysertacja prezentuje dobry poziom naukowy w każdym z zaprezentowanych artykułów, ale podsumowanie mogłoby skłonić do dyskusji i umożliwić porównywanie uzyskanych w ramach tej dysertacji wyników na tle obecnych wyników badań.

Opis badań zamyka spis literatury na 5 stronach (62 pozycje), z którego ponad 17 pozycji to literatura opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat.

#### **Uwagi i pytania:**

- Str. 6 - błąd w pisowni: „chodzących” powinno być: „wchodzących”
- Str. 13 – błąd gramatyczny „tłuszczy jadalnych” powinno być: „tłuszczów jadalnych”

- Str. 13 – proszę o wyjaśnienie zdania: „*Dodatkowym atutem oleju rzepakowego jest umiarkowana zawartość **niepożądanych** w diecie człowieka **wielonienasyconych** kwasów tłuszczowych.*” Czy w zdaniu tym wkradł się błąd drukarski? To zdanie wprowadza wątpliwości i niejasności w logice wyводу.
- Str. 15 – błąd gramatyczny „Obecnie ponad 60 procent uprawianych odmian posiada odporność na co najmniej jednego patogena.” powinno być; „Obecnie ponad 60 procent uprawianych odmian posiada odporność na co najmniej jeden patogen”.
- Wykazano w spisie literatury opracowanie: *Bartkowiak-Broda I., Rouselle P., Renard M. (1979) Investigations of two kinds of cytoplasmic male sterility in rapeseed (Brassica napus L.). Genet Pol 20: 487–497*, której cytowania brak w tekście rozprawy doktorskiej.

**W tym miejscu bardzo proszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących zagadnień.**

1. Ze względu na coraz szersze wykorzystanie oleju i białka z nasion rzepaku programy hodowli ukierunkowane są na wytwarzanie odmian i form hodowlanych cechujących się przede wszystkim wysoką plennością, odpornością na stresy abiotyczne i biotyczne, a także określonymi cechami jakościowymi, jak zróżnicowana zawartość kwasów tłuszczowych w oleju nasion, wysoka zawartość tłuszczu i białka, czy niska zawartość włókna. Obecnie do dyspozycji rolników jest szeroki wachlarz odmian rzepaku ozimego zarówno populacyjnych (liniowych), jak i mieszańcowych. Co zatem wybrać w przypadku tej rośliny? Proszę omówić zalety i wady obu grup odmian w przypadku rzepaku.

2. W związku z istniejącym na świecie problemem marnowania żywności na każdym etapie produkcji i dystrybucji, ciągle zwiększającą się liczbę ludności oraz zmniejszający się areał pól uprawnych, stanowiących podstawowe źródło pożywienia, bardzo ważne jest poszukiwanie nowych możliwości wykorzystania odpadów żywnościowych w przemyśle spożywczym. W przeglądzie literatury wspomniała Pani, że pozostała po ekstrakcji (bądź wytłoczeniu) oleju śruta poekstrakcyjna/makuch jest źródłem wysokobiałkowej paszy dla zwierząt hodowlanych (przeżuwaczy i trzody chlewnej). Moje kolejne pytanie, które nasunęło mi się podczas lektury. Czy w trakcie przeglądu literatury spotkała się Pani z informacją o wykorzystaniu makuchów w żywieniu człowieka? Czy makuchy mogłyby spełniać kryteria określone dla białka alternatywnego w żywieniu człowieka? Czy i jakie mają wartości odżywcze?

3. Praca doktorska dotyczyła tylko cech fenotypowych i genotypowych związanych ze wzrostem i plonem, ale interesuje mnie informacja, czy przeprowadzała Pani lub zespół, z którym Pani pracuje, badania nad porównywaniem korelacji wpływu heterozji na plon i zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych. Czy takie badania są przewidywane lub realizowane w Państwa zespole. W dobie ważności olejów roślinnych, szczególnie tłoczonych na zimno, znaczące byłoby uzyskanie formy o wysokim plonowaniu i dużej zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT).

Przedstawione w pracy nieścisłości w tekście są bardzo nieliczne i nie umniejszają wartości opracowania.

## OCENA KOŃCOWA

Przedstawiona praca w moim przekonaniu jest wartościowa, badania dobrze, w sposób przemyślany wykonane i opracowane z wykorzystaniem wielu metod statystycznych, co jest ważne w pracach tego typu. Wyrażam pełne przekonanie, że słuszne było przyjęcie powyższego tematu dysertacji, który oceniam jako niełatwy, czasochłonny i wymagający powiązania typowej wiedzy rolniczej z elementami biologii molekularnej, a przede wszystkim z zapoznaniem się i opanowaniem różnych statystycznych narzędzi stosowanych dla tego typu badań. Jestem przekonana, że bez względu na długoletnie badania nad tym tematem oraz trudności, które są napotykanie w tej dziedzinie, potrzeba nam specjalistycznych badań i prac poświęconych temu zagadnieniu. **Są to główne powody, dla których uważam, że problem, któremu poświęcona jest niniejsza rozprawa, jest niezwykle ważny i wart szczegółowego zbadania (co uczyniła Doktorantka) zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia.** Aplikacyjny charakter doktoratu jest oczywisty, widoczny w możliwości wykorzystania wyników w hodowli rzepaku.

Praca doktorska mgr Joanny Wolko pt.: „Fenotypowa i genotypowa analiza efektu heterozji w mieszańcach rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)” **spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, w dyscyplinie agronomia.** Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie **o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.**

*Czyczyło-Mysza*  
Ilona Czyczyło-Mysza