

dr hab. inż. Mirosław Tyrka, prof. PRz
Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki
Politechnika Rzeszowska im. I. Łukasiewicza
Al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Hary-Skrzypiec
pt. „Analiza genetyczna odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową oraz
wybranych cech jakości i morfologii bulw diploidalnych mieszańców ziemniaka
(*Solanum tuberosum* L.)”**

wykonanej w Zakładzie Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB pod opieką promotora prof. dr hab. Ewy Zimnoch-Guzowskiej i promotora pomocniczego dr hab. Jadwigi Śliwki, prof. nadzw. IHAR-PIB

Przedmiot rozprawy i jego znaczenie naukowe

Ziemniak jest cenną gospodarczo rośliną i ważnym źródłem kalorii dla wyżywienia ludzi. Podejmowana w pracy tematyka analizy uwarunkowań genetycznych odpowiedzialnych za ciemną plamistość poudzerzeniową (CPP) oraz cechy jakościowe i morfologiczne bulw jest ważna ze względu na ograniczenie strat plonu ziemniaka, wymogi przemysłu przetwórczego oraz preferencje konsumentów. Badanie uwarunkowań genetycznych odpowiedzialnych za omawiane w pracy cechy jest w pełni uzasadnione ze względu na strategiczne znaczenie ziemniaka w Polsce.

Badania przeprowadzono na dwóch unikalnych zestawach genotypów. Pierwszy zestaw obejmował szeroką pulę genetyczną i liczył 31 diploidalnych klonów mieszańców uzyskanych z krzyżowań pomiędzy 11 gatunkami z rodzaju *Solanum*. Uzyskanie i charakterystyka takich mieszańców zróżnicowanych pod względem odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową, choroby wirusowe, grzybowe i bakteryjne stanowi odzwierciedlenie długoterminowej strategii zmierzającej do identyfikacji odpowiednich genów i kontrolowanego ich wprowadzenia do odmian uprawnych. Szeroka zmienność genetyczna obecna w mieszańcach stwarza możliwość identyfikacji nowych genów o dużym potencjale w praktycznej hodowli ziemniaka.

Drugi zestaw genotypów stanowiła populacja mapująca wyprowadzona z krzyżowania klonów o różnicowanej odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową i odmiennych

cechach jakościowych. Charakterystyka fenotypowa wybranych klonów wskazuje, że użyteczność populacji F1 11-36 jest dużo większa i może być ona wykorzystana również m.in. do identyfikacji loci cech ilościowych (QTL) lub genów kandydujących dla ważnych patogenów ziemniaka. Reasumując, wykorzystany materiał badawczy zapewnia wysoką wartość naukową i nowatorstwo zidentyfikowanych efektów oraz stwarza duże szanse na praktyczne wykorzystanie zidentyfikowanych markerów. Dodatkowo, w celu wyjaśnienia podłoża genetycznego odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową i cech jakościowo-morfologicznych bulw ziemniaka trudno jest sięgać do mechanizmów poznanych u roślin modelowych.

Forma pracy i przegląd literatury

Rozprawa doktorska ma formę zbioru trzech publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o łącznym współczynniku wpływu wynoszącym 5.585. Pani Agnieszka Hara-Skrzypiec jest w tych artykułach pierwszym, korespondencyjnym autorem o największym udziale potwierdzonym oświadczeniami. Praca doktorska liczy 99 stron zorganizowanych w formie 11 rozdziałów. Tytuł jest zgodny z treścią pracy. Kolejne rozdziały poprzedzone są wykazem publikacji oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. W przeglądzie literatury (17 stron) omówiono m.in. znaczenie gospodarcze ziemniaka i realizowanych badań, klasyfikację uszkodzeń mechanicznych bulw ziemniaka, mechanizm biochemiczny ciemnienia miąższu wywoływanego również mechanicznie. Przedstawiono czynniki środowiskowe (nawożenie, przebieg pogody w czasie wegetacji i warunki przechowywania) i fizjologiczno-biochemiczne (wielkość i przyleganie, turgor i zawartość skrobi w komórkach) wpływające na powstawanie ciemnej plamistości poudzerzeniowej. Ta część pracy wskazuje na istotne znaczenie rodziny genów kodujących oksydazę polifenolową i rolę tego enzymu w odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową.

W dalszej części przeglądu omówiono genetyczne uwarunkowania odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową i ciemnienie enzymatyczne miąższu bulw ziemniaka, obejmujące odziedziczalność, oraz wyniki badań genetycznych i proteomicznych prowadzące do wytypowania genów kandydujących. W końcowej części tego rozdziału przedstawiono również uwarunkowania genetyczne niektórych cech morfologiczno-biochemicznych potencjalnie związanych z CPP (m.in. zawartości skrobi w bulwie, ciężaru bulwy, barwy miąższu). Całość przeglądu literatury jest napisana bardzo starannie. Doktorantka w wyczerpujący i rzeczowy sposób wprowadziła w tematykę pracy.

Cele rozprawy i zastosowane metodyki badawcze

Cel rozprawy został jasno sprecyzowany w pięciu punktach i zakończony hipotezą naukową o złożonych uwarunkowaniach genetycznych CPP powiązanych z wybranymi cechami jakości i morfologii bulw. Opis materiałów i metod liczy 6 stron. Jak wcześniej wspomniano badania przeprowadzono na unikalnym materiale, reprezentującym dużą zmienność genetyczną idealnie dostosowanym do zaplanowanych analiz genetycznych. Badano również linie referencyjne. Materiał pod względem liczebności jest wystraszający do określenia statystycznie istotnych efektów genetycznych determinujących badane cechy.

Wszystkie części doświadczenia obejmujące fenotypowanie zostały skrupulatnie i prawidłowo zaplanowane oraz zrealizowane. Genotypowanie wykonane metodą DArT stanowiło podstawę konstrukcji mapy genetycznej. Obecnie są dostępne systemy bazujące na polimorfizmach pojedynczych nukleotydów, jednak system DArT pozwala na wygenerowanie danych o wystarczającym wysyceniu. Bardzo cennym elementem pracy jest włączenie analizy segregacji 9 genów kandydujących.

Prawidłowość opracowania statystycznego danych nie budzi żadnych zastrzeżeń. Można zauważyć drobną nieścisłość we wzorze do obliczenia odziedziczalności. W dwóch pracach wartości mianownika są podane bez nawiasów. Metodyka liczenia mapy genetycznej i identyfikacji QTL-i jest prawidłowa. Jakkolwiek, perspektywicznie przy zwiększaniu liczby markerów na chromosomach wykorzystane mapowanie regresyjne może się okazać zbyt czasochłonne i lepszym rozwiązaniem może być wykorzystanie algorytmów maksymalnego prawdopodobieństwa. Podobnie jeśli chodzi o identyfikację samych rejonów QTL, często mapowanie interwałowe może być mniej precyzyjne niż złożone mapowanie interwałowe dostępne w darmowych programach. Można też rozważyć transformację danych, które nie posiadają rozkładu normalnego lub zastosowanie testów nieparametrycznych typu test Kruskala-Wallisa wspomaganą analizą asocjacyjną.

Najważniejsze uzyskane wyniki i uwagi krytyczne

W rozdziale „Omówienie wyników” przedstawiono syntetycznie najważniejsze informacje zawarte w opublikowanych artykułach. Kolejne prace stanowią logiczną całość. W pierwszym etapie scharakteryzowane materiały posłużyły do wyboru optymalnych komponentów do uzyskania populacji segregującej pod względem CPP i wybranych cech morfologiczno-biochemicznych badanych w pracy. Wykazano, że bulwy o wyższej zawartości skrobi charakteryzują się wyższą skłonnością do ciemnej plamistości poudzerzeniowej. Wyniki

przedstawione w pracy opublikowanej w American Journal of Potato Research odpowiadają pierwszemu celowi szczegółowemu pracy.

W drugiej pracy opublikowanej w Molecular Genetics and Genomics potwierdzono zależności pomiędzy zawartością skrobi a CPP rozszerzone o indukcję uszkodzeń bębniem obrotowym i aparatem uderzeniowym. Zidentyfikowano również QTL-e dla CPP niezależnego od zawartości skrobi i ciemnienia enzymatycznego. Zidentyfikowano 3 QTL o wspólnej lokalizacji dla CPP i odporności na ciemnienie enzymatyczne. Dwa spośród 9 testowanych markerów bazujących na genach (*POT32* i *AGPaza S*) były związane z ciemnieniem enzymatycznym. Szczególnie interesujący jest QTL z chromosomu V z efektem głównym odporności na CPP niezależnym od zawartości skrobi i metody indukcji uszkodzeń. Wyniki przedstawione w drugim artykule stanowią odpowiedź na cele szczegółowe badań nr 2-4.

W trzeciej pracy zidentyfikowano szereg QTL-i dla cech morfologicznych bulwy (kształtu, barwy miąższu, regularności zarysu, głębokości oczek i średniego ciężaru bulwy). Uzyskane QTL-e przedyskutowano w odniesieniu do wyników poprzednich badań dotyczących analizowanych cech. Przedstawione wyniki pośrednio wyczerpują 5 cel szczegółowy. Związek pomiędzy wybranymi cechami morfologiczno-biochemicznymi z CPP jest omówiony w przeglądzie literatury, natomiast przypuszczalnie można się pokusić o kolokalizację niektórych QTL-i zidentyfikowanych w artykułach 2 i 3. Wstępna analiza sugeruje, że QTL dla średniego ciężaru bulwy z chromosomu V z pozycji 32.5 cM może odpowiadać QTL dla SCB_{FB}.

Praca jest napisana bardzo starannie. Błędy edytorskie i w cytowaniach są bardzo rzadkie.

Wniosek końcowy

W pracy zbadano uwarunkowania genetyczne odporności na ciemną plamistość poudzerzeniową oraz potencjalnie związane z nią cechy biochemiczno-morfologiczne bulw ziemniaka diploidalnego. Pozytywnie zweryfikowano postawioną hipotezę naukową.

Rozprawę doktorską Pani Agnieszki Hary-Skrzypiec należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu nowoczesnej metodyki, co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim. Praca jest oryginalnym opracowaniem naukowym i świadczy o dużej wiedzy teoretycznej Doktorantki.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji pracy stwierdzam, iż spełnia ona wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim w artykule 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) oraz w rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków

przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. z 2018 r. poz. 261). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Hary-Skrzypiec do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie pracy.

/Miroslaw Tyrka/

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'm. tyrka', is centered below the typed name.