

Prof. dr hab. Marcin Rapacz
Katedra Fizjologii Roślin
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy *im. H. Kollątaja* w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Mgr Iwony Wąsek zatytułowanej „Identyfikacja rejonów genomu (QTL) i markerów molekularnych związanych z mrozoodpornością pszenżyta (*xTriticosecale* Wittm.)”

Rozprawa doktorska Pani Mgr Iwony Wąsek podejmuje ciekawe zagadnienie mapowania loci cech ilościowych (QTL) związanych z mrozoodpornością. Badania prowadzone były na pszenżycie, u którego wiedza na temat genów odpowiedzialnych za kształtowanie mrozoodporności jest bardzo ograniczona i w przeciwieństwie do innych gatunków zbóż mapowanie QTL-i mrozoodporności nie było dotychczas prowadzone. Dodatkową wartością pracy jest porównanie QTL-i dla różnych metod oceny mrozoodporności. W pracy zmapowano bowiem przeżywalność roślin w polowo-laboratoryjnym (skrzynkowym) teście mrozoodporności, wyniki pomiarów fluorescencji chlorofilu (uszkodzenia aparatu fotosyntetycznego) wykonywanych po mrożeniu odciętych liści pobieranych z pola w ciągu zimy oraz wyniki pomiarów wypływu elektrolitów (uszkodzenia błon komórkowych) na analogicznym materiale. Takie porównanie QTL-i ma również charakter pionierski. Do oceny spowodowanych przez mróz uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego użyto pomiarów szybkiej kinetyki indukcji fluorescencji chlorofilu, których wyniki analizowane były z pomocą analizy OJIP. Jest to metoda nowoczesna, znajdująca coraz szersze zastosowanie w monitoringu wpływu środowiska na rośliny. Badania wykonano na populacji mapującej pszenżyta Hewo × Magnat, której mapa genetyczna nie została dotychczas opublikowana. Badania prowadzone były w ciągu dwóch zim. W każdej badano dwie niezależne serie doświadczalne.

Rozprawę doktorską Pani Iwony Wąsek należy uznać za samodzielne rozwiązanie problemu badawczego przy użyciu adekwatnej i nowoczesnej metodyki badań co jest warunkiem ustawowym stawianym rozprawom doktorskim.

We wstępie do pracy scharakteryzowano historię hodowli, genetykę oraz znaczenie gospodarcze pszenżyta. Opis ten jest syntetyczny i kompetentny. Wkradła się tu jednak pewna nieścisłość. Doktorantka pisząc o powierzchni uprawy pszenżyta w Polsce powołując się na dane GUS z 2013 roku (podany w pracy link nie jest aktywny) pisze, iż pszenżyto zajmuje wśród zbóż *ex*

aequo drugie miejsce pod względem powierzchni uprawy, tymczasem w cytowanym roku uprawiano więcej pszenżyta niż żyta (odpowiednio 15,8% i 15,5% ogólnej powierzchni uprawy zbóż). Wstęp obejmuje też wnikliwą charakterystykę tworzenia map genetycznych i mapowania QTL. Zagadnienia te wyjaśniane są szczegółowo i kompetentnie co świadczy o dobrej znajomości tematu. Nie zabrakło też informacji o zimotrwałości, mrozoodporności i procesach hartowania i rozhartowywania roślin. Autorka spróbowała też pokazać powiązania pomiędzy stosowanymi w pracy metodami oceny mrozoodporności co świadczy o jej dociekliwości. Trzeba przy tym zauważyć, że schemat podany na Ryc. 1 jest niekompletny, gdyż mierzony w pracy wpływ elektrolitów powodowany jest nie tylko działaniem reaktywnych form tlenu i peroksydaz, ale i bezpośrednimi fizycznymi efektami krystalizacji wody w przestworach międzykomórkowych, czy też we wnętrzu komórek. Szkoda również, że we wstępie nie omówiono metod oceny mrozoodporności oraz problemów związanych z ich walidacją. Z kolei zgłębienie tego problemu mogłoby doprowadzić do uniknięcia błędnego stwierdzenia o którym mowa w kolejnym akapicie recenzji.

W rozdziale **cele pracy** poza lokalizacją rejonów genomu pszenżyta związanych z mrozoodpornością postawiono dość ryzykowną hipotezę w myśl której „zachowanie sprawności aparatu fotosyntetycznego oraz zachowanie integralności membran komórkowych po przemrożeniu stanowi fizjologiczne podłoże mrozoodporności”. Obniżenie sprawności działania aparatu fotosyntetycznego oraz uszkodzenia błon komórkowych w tkankach liścia są bowiem efektem działania mrozu a nie podłożem mrozoodporności i jako takie stanowią fizjologiczne markery mrozoodporności, o czym doktorantka pisze w dyskusji. Natomiast zastosowana w pracy metodyka umożliwiła sprawdzenie w jakim stopniu te fragmentaryczne pomiary uszkodzeń związane są z przeżywalnością roślin. Weryfikacja ta została wykonana zarówno na poziomie korelacji fenotypowej jak i na poziomie kontroli genetycznej. Podobne zastrzeżenie mam też do sformułowania wniosku nr 3 dotyczącego tego właśnie zagadnienia.

Materiały i metody zostały opisane w sposób na ogół kompletny i nie budzący wątpliwości zarówno co do doboru materiału do badań jak i prawidłowości przeprowadzonych eksperymentów, zastosowanych metod analitycznych oraz wykonanych analiz statystycznych. Trzeba zauważyć, że w żadnym miejscu pracy nie została podana interpretacja wyliczanego w analizie QTL parametru Add (nazywanego zresztą konsekwentnie efektem adytywnym zamiast addytywnym). Z kolei parametr $-2\ln(L0/L1)$ objaśniono zbyt lakonicznie jako „stosunek prawdopodobieństwa dla analizy SMA.”

Wyniki zaprezentowane w pracy należy uznać za bardzo wartościowe.

Ustalono 6 rejonów genomu (QTL) powtarzalnych w niezależnych eksperymentach i związanych z przeżywalnością roślin. Zlokalizowane zostały one na chromosomach: 4A, 7A, 1B,

2B, 7B, 4R. Na tej podstawie wskazano 46 markerów związanych z QTL mrozoodporności jako markery kandydujące do dalszych prac nad wyłonieniem zestawu markerów przydatnych do selekcji form mrozoodpornych w hodowli pszenżyta ozimego.

Stwierdzono też, że na chromosomach 4A, 4R i 5R, QTL mrozoodporności zajmowały to samo położenie, które zmapowano dla parametrów określających fotochemiczną aktywność fotosystemu II i integralności membran komórkowych po przemrożeniu. Wynik ten potwierdza, że kontrola genetyczna przeżycia roślin i uszkodzeń aparatu fotosyntetycznego, czy tkanek liści (a więc na poziomie komórkowym a nie całości organizmu) była w zastosowanym układzie doświadczalnym częściowo podobna. Bardzo cenne będzie tu ustalenie w przyszłości genów, nie tyle tych znajdujących się we wspólnych dla tych cech regionach, ale tych, które kształtują mrozoodporność jedynie na poziomie całego organizmu, a więc w regionach QTL unikalnych dla przeżywalności roślin.

Ponadto stwierdzono, że kilkanaście badanych linii cechowała transgresja mrozoodporności w stosunku do bardziej mrozoodpornego rodzica. Wskazuje to na możliwość dalszej poprawy mrozoodporności pszenżyta w toku tworzenia mieszańców z użyciem obecnej w polskiej hodowli roślin puli genowej. Dodatkowo selekcja tych materiałów może być potencjalnie prowadzona przy użyciu rozwijanego na bazie wyników pracy pani Wąsek zestawu markerów molekularnych.

Uzyskane wyniki opisane zostały w sposób czytelny i kompletny. Można zastanawiać się nawet nad sensownością prezentowania wszystkich zawartych w pracy tabel i wykresów. Szczególnie dotyczy to Tabel 8 do 14, które moim zdaniem powinny być zresztą zakwalifikowane jako ryciny. Tak naprawdę, choć są one ładne graficznie, a ich przygotowanie kosztowało zapewne sporo wysiłku pokazują one to samo co zaprezentowano w Tabeli 20 jako wartości współczynników korelacji liniowej, czyli związek pomiędzy przeżywalnością roślin a uszkodzeniami mrozowymi aparatu fotosyntetycznego, czy błon komórkowych. Tabelę 20 też można było zmniejszyć poprzez rezygnację z pokazywania związków pomiędzy różnymi parametrami fluorescencji chlorofilu co jest trudne w interpretacji, gdyż wysokie wartości współczynników często wynikają z podobnych sposobów wyliczania poszczególnych wskaźników.

Obszerna dyskusja (23 strony) w sposób kompetentny omawia różne aspekty uzyskanych własnych wyników na tle danych literaturowych.

W pracy sformułowano pięć zwięzłych i, z wyjątkiem wniosku nr 3 (o czym pisałem wcześniej) poprawnych wniosków.

W pracy cytowane jest 285 pozycji literatury i 8 stron internetowych.

Strona techniczna pracy nie budzi większych zastrzeżeń. Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, a tabele i ryciny są przejrzyste i czytelne. Wspomnieć jednak trzeba, że w pracy można znaleźć wiele stwierdzeń językowo niezgrabnych (ale nie niepoprawnych), np. „nie

bez znaczenia w procesie aklimacji do niskich temperatur jest rola białek AFP”, czy „zachodzą zmiany w kierunku odpowiedniej kompozycji poszczególnych składników membran”. Trochę mylące bywa też używanie przez doktorantkę w opisie wyników, dyskusji i wnioskach określenia „mrozoodporność” jako synonimu „przeżywalności roślin”. Mrozoodporność (z definicji stopień uszkodzeń przez mróz) oceniana była przecież w pracy trzema różnymi metodami.

Streszczenia pracy (w języku polskim i angielskim) są zwięzłe i bardzo dobrze charakteryzują najważniejsze aspekty pracy.

Biorąc pod uwagę wszystkie aspekty przedstawionej mi do recenzji rozprawy stwierdzam, iż spełnia ona kryteria stawiane rozprawom doktorskim w Artykule 13 Ustawy o Stopniach i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Iwonę Wąsek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie z uwagi na pionierski charakter badań, naukową wartość uzyskanych wyników i ich potencjalnie aplikacyjny charakter **wnoszę do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.**

Prof. dr hab. Marcin Rapacz

