

Dr hab. Beata Myśków

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny

w Szczecinie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Cyganek,

pt. „Identyfikacja *loci* cech ilościowych (QTL) warunkujących wysokość plonu i zawartość cukrów pszenicy w warunkach suszy glebowej”

TEMATYKA BADAWCZA

Praca doktorska została wykonana w Instytucie Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk pod kierunkiem dr hab. Ilony Czyczyło-Myszy i dr Michała Dziurki, w toku studiów doktoranckich, w Studium Doktoranckim Nauk Przyrodniczych Polskiej Akademii Nauk w Krakowie z siedzibą w IB PAN.

Przedmiot badań stanowiła pszenica zwyczajna, jeden z najważniejszych w Polsce i na świecie gatunków zbóż, wykorzystywany do celów żywieniowych człowieka i jako źródło paszy. Podjęte przez Doktorantkę badania stanowią element szerokiej tematyki badawczej dotyczącej analizy mechanizmów odporności roślin na suszę. Niedobory wody i susza dotyczą wielu rejonów całego globu i dotyczą także naszego kraju. Z analiz warunków klimatycznych Polski wynika, że co 5-6 lat występują lata suche, a co 10-11 lat – bardzo suche. Co roku występują też okresowe, trwające nawet kilka tygodni niedobory opadów. Są to groźne dla produkcji rolnej okresy, szczególnie dotkliwe w przypadku gleb lekkich, zajmujących w Polsce ponad połowę powierzchni wszystkich użytków rolnych. Szczególnie niebezpieczna dla plonowania jest susza występująca coraz częściej w uprawach zbóż.

Doktorantka podjęła się oceny wpływu suszy glebowej na zmienność i zależności elementów składowych plonu oraz zawartości wybranych cukrów w liściu flagowym, dokłosiu i kłosie pszenicy zwyczajnej, w warunkach doświadczenia wazonowego, a także prześledzenia genetycznych uwarunkowań tej zmienności, poprzez analizę QTL badanych cech.

STRUKTURA PRACY I STRONA JĘZYKOWA

Rozprawa jest bardzo obszerna; liczy 180 stron i jest podzielona na 5 głównych rozdziałów („*Wprowadzenie*” – 16 stron, „*Cele badań*” – 1 strona, „*Materiał badań i metody*” – 6 stron, „*Wyniki*” – 84 strony, „*Dyskusja*” – 42 strony). Oprócz tego, przed główną częścią pracy, zamieszczono „*Spis treści*” (2 strony) i „*Wykaz zastosowanych skrótów*” (2 strony, 50 symboli). Przed wykazem źródeł bibliograficznych zamieszczono dwustronicowe „*Podsumowanie i wnioski*”. W pracy znalazło się 19 zestawień tabelarycznych (materiał dokumentujący wyniki ujęto w 15 tabelach, 4 zaś tabele zamieszczono w „*Dyskusji*”) i 23 ryciny. „*Spis literatury i źródeł internetowych*” obejmuje 289 pozycji, z czego większość to artykuły anglojęzyczne. Opracowanie kończy „*Streszczenie*” w języku polskim i angielskim („*Abstract*”).

Struktura pracy jest dobrze dopasowana do charakteru pracy i specyfiki omawianych zagadnień. W mojej ocenie nieprawidłowo zamieszczono jednak podrozdział 4.1 (str. 32), „*Warunki pogodowe*” w rozdziale „*Wyniki*”. Ta część powinna znaleźć się w rozdziale „*Materiał badań i metody*”.

Dobrym pomysłem Doktorantki było zamieszczenie na początku pracy, przed „*Wprowadzeniem*” „*Wykazu zastosowanych skrótów*”. W wykazie tym zabrakło konsekwencji co do pisowni terminów (niektóre pisano małą, inne wielką literą). Zabrakło w nim także rozwinięcia skrótu SPAD, a określenie to pojawiło się w pracy kilkakrotnie, także bez wyjaśnienia, w rozdziale „*Dyskusja*”, w tekście na str. 137 (wers 3 i 5) i w *Tabeli 17* w kolumnie zatytułowanej „cecha” (str. 151, 152 i 157).

Ryciny od 3 do 23, wydrukowano na dużym formacie (A3), co czyni je bardziej czytelnymi, jednak tytuł staje się widoczny dopiero po rozłożeniu kartki, co utrudnia odnalezienie poszukiwanego wykresu. Z tego powodu tytuły tych grafik powinny zostać zamieszczone w prawym górnym rogu, nie zaś na środku strony.

Praca napisana jest poprawnym, przystępnym językiem. W obszernym tekście pojawiły się nieliczne błędy natury interpunkcyjnej oraz kilka, niepoprawnych lub nieodpowiednich czy też niezręcznych sformułowań (np. „*aborcja pędów*” – str. 14, wers 7; „*wariacje*” w odniesieniu do metody IM – str. 20, wers ostatni; „*charakteryzacja cech*” – str. 22, wers 3 od dołu; „*wspólny mianownik*” w odniesieniu do markera – str. 77, wers 3) oraz parę błędów stylistycznych, z których zwłaszcza jeden wydaje się rażący, jako że znalazł się w sekcji „*Podsumowanie i wnioski*” (str. 158, punkt 2: „*Przy optymalnym*

nawadnianiu zawartość cukrów rozpuszczalnych w liściu flagowym jest najsilniej skorelowana z elementami składowymi plonu, a najslabiej w dokłosiu”). Dość chaotycznie brzmi także opis materiału roślinnego do badań dotyczący populacji mapującej (str. 26, wersy 3-8).

OCENA TREŚCI

Tytuł rozprawy doktorskiej jest adekwatny do zawartych w niej treści, chociaż powinien zostać nieco rozszerzony i brzmieć „*Identyfikacja loci cech ilościowych (QTL) warunkujących wysokość plonu i zawartość cukrów pszenicy w warunkach kontrolnych i suszy glebowej*”, co pełniej oddawałoby zakres tematyki badawczej.

Przy nazwie badanego gatunku powinien znaleźć się dopisek „zwyczajna” To wykluczyłoby mogące pojawić się ewentualne wątpliwości, o który gatunek pszenicy chodzi. Jednoznacznie na przedmiot badań mogłaby też wskazywać nazwa łacińska, a ta nie pojawiła się ani w tytule, ani w tekście, gdy po raz pierwszy mowa jest o pszenicy zwyczajnej („*Wprowadzenie*”, str. 11).

Omówienie rozdziału „Wprowadzenie”

We wstępie rozprawy zawarto przegląd najważniejszych zagadnień dotyczących tematyki badawczej. Pokróctce omówione zostały skutki suszy dla rolnictwa oraz możliwe rozwiązania problemu w zakresie prowadzenia badań na rzecz hodowli roślin. Dokonano tu także charakterystyki badanego gatunku, opisano pochodzenie pszenicy zwyczajnej, jej znaczenie i sposoby wykorzystania. Podczas omawiania podziału na klasy pszenicy związanego z potrzebami wernalizacyjnymi wkraść się drobny błąd, w zdaniu ze str. 12: „*Różnice w grupie genów wernalizacyjnych [...] dzielą pszenice na dwie klasy: jare (dominujące) oraz ozime (recesywne)*.” O ile pojęcia jare i ozime odnoszą się do typów pszenic to określenia w nawiasach (dominujące i recesywne) dotyczą alleli, które warunkują te klasy a nie samych klas.

We „*Wprowadzeniu*” znalazły się także tematy związane ze zjawiskiem suszy: definicje suszy, wpływ stresu suszy na pszenicę, możliwe mechanizmy obronne, w tym rola cukrów rozpuszczalnych w plonowaniu roślin oraz adaptacji do stresu suszy.

Osobny podrozdział poświęcono opisowi QTL elementów składowych plonu i zawartości cukrów rozpuszczalnych. W tej części znalazła się informacja o możliwościach wykorzystania wyników tego typu badań do selekcji z użyciem

markerów molekularnych (MAS). Nie zgodziłabym się ze zdaniem, że „*najbardziej obiecujące w tym zakresie*” są markery RFLP, RAPD, SSR i AFLP (str. 23, wers 11). RFLP i AFLP są dość skomplikowane technicznie, aby mogły być wykorzystywane na potrzeby MAS; RAPD są z kolei zbyt niestabilne. Każdy z wymienionych typów markerów może zostać poddany przekształceniu w SCAR (sequence characterized amplified region) i ten właśnie typ wydaje się odpowiedni na potrzeby praktycznego wykorzystania w selekcji. Warto byłoby przy tej okazji wspomnieć także o technikach wysokoprzepustowych, bazujących na mikromacierzach i danych sekwencyjnych, np. o wykorzystanych do tworzenia mapy badanej populacji pszenicy markerach DArT czy o DArTseq.

Przegląd literatury przedstawiony w ramach „*Wprowadzenia*” wykonany został rzetelnie, a wszystkie związane z tematem pracy zagadnienia zostały omówione wyczerpująco. Ze względu na popularność pszenicy jako przedmiotu badań i szeroki zakres tematyki badawczej (połączenie zagadnień z biochemii, fizjologii, genetyki i agronomii) doktorantka musiała zapoznać się z bardzo licznymi źródłami bibliograficznymi, co wymagało dużego nakładu pracy. Zestawienie zacytowanych prac świadczy o dużej znajomości literatury przedmiotu oraz o umiejętności dokonania właściwego doboru i syntetycznego opracowania licznych materiałów źródłowych.

Omówienie rozdziału „Cele badań”

Cele badań sformułowano z podziałem na cele poznawcze i aplikacyjne. Jako cele poznawcze wymienione zostały 1) „*identyfikacja QTL wybranych elementów składowych plonu i zawartości cukrów rozpuszczalnych w wybranych organach asymilacyjnych (liść flagowy, dokłosisie, kłosisie) roślin populacji mapującej linii podwojonych haploidów (CSDH) pszenicy w warunkach stresu suszy glebowej i optymalnego nawodnienia*” 2) „*analiza rozmieszczenia na chromosomach zidentyfikowanych QTL elementów składowych plonu i zawartości cukrów rozpuszczalnych oraz wskazanie regionów o działaniu plejotropowym*” i 3) „*wskazanie regionów genomu oraz markerów molekularnych stabilnych oraz najsilniej sprzężonych z badanymi cechami ilościowymi*”.

W ramach założeń aplikacyjnych Doktorantka podjęła się 4) „*określenia możliwości wykorzystania zawartości cukrów w liściu flagowym, dokłosisiu oraz kłosisie jako wskaźnika plonowania w suszy oraz przy optymalnym nawadnianiu*” oraz 5) „*wytypowania regionów oraz markerów molekularnych przydatnych do*

selekcji genotypów o zwiększonym plonowaniu i podwyższonej odporności na stres suszy z możliwością wykorzystania w hodowli roślin”.

Według mnie pominięty został cel poznawczy dotyczący badania zmienności i zależności elementów składowych plonu oraz zawartości cukrów w liściu flagowym, dokłosiu i kłosie, w warunkach stresu suszy glebowej i optymalnego nawodnienia. Powinien on pojawić się jako pierwszy z wymienianych. Aż dwanaście stron w rozdziale „*Wyniki*” poświęcono temu zagadnieniu i było ono podstawą do dalszych analiz związanych z lokalizacją QTL na mapie genetycznej oraz przy próbie wytypowania wskaźnika plonowania.

Przy wymienianiu celów zabrakło także wyszczególnienia analizowanych cech, zarówno w odniesieniu do plonu jak i rodzajów cukrów.

Kolejna uwaga dotyczy celu 2) a konkretnie błędnie użytego w nim, a także w dalszych częściach pracy pojęcia „*regionów [genomu] o działaniu plejotropowym*”. Pojęcie plejotropii odnosi się do genów, a nie do regionów genomu. Jest rzeczą naturalną, że geny kontrolujące różne cechy są pogrupowane i sprzężone w ramach chromosomów (regionów genomu). Plejotropia to zjawisko wpływu pojedynczego genu na wiele cech organizmu.

Omówienie rozdziału „*Materiał badań i metody*”

Doktorantka przeprowadziła w swojej pracy naukowej bardzo liczne pomiary i zróżnicowane analizy, zarówno z zakresu fenotypowania, analizy chemicznej, biochemii jak i analizy statystycznej. Prowadzenie czteroletniego doświadczenia wazonowego na tak szeroką skalę (94 genotypy populacji mapującej w dwóch wariantach - kontrola/susza i w trzech powtórzeniach), z kontrolowaniem wilgotności gleby wymagało ogromnego nakładu pracy.

Rozdział „*Materiał badań i metody*” przedstawia dokładną charakterystykę metod badawczych. Został on opatrzony starannie przygotowanym materiałem ilustracyjnym, w formie dwóch fotografii, na które składało się łącznie 10 zdjęć.

Doktorantka dysponowała materiałem roślinnym, który stanowiła populacja mapująca linii podwojonych haploidów pszenicy (CSDH), wyprowadzona przez prof. Steve’a Quarriego i wykorzystywana wcześniej do innych badań, m.in. zawartości barwników asymilacyjnych (Czyczyło-Mysza i wsp. 2013). Było to rozwiązanie zasadne i korzystne, z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze pozwoliło zaoszczędzić czas potrzebny na żmudne wyprowadzanie nowego materiału i skupić się od razu na konkretnych analizach, w ramach podjętego tematu badawczego (możliwe były dzięki temu badania czteroletnie, co jest obecnie raczej rzadkością w ramach studiów doktoranckich).

Po drugie, dzięki temu dostępny był bogaty materiał do analiz porównawczych w postaci wyników badań genetycznego podłoża innych cech, uzyskanych już wcześniej dla tej samej populacji.

Przy lekturze podrozdziału **3.4. Pomiary biochemiczne** nasuwają się pewne uwagi dotyczące sekcji **3.4.3. Badanie składu puli cukrów**. Tak sformułowany tytuł sugeruje analizę, która da odpowiedź na pytanie jakie cukry i w jakich proporcjach zawarte były w badanych ekstraktach roślinnych z liści, dokłosi i kłosów. Tymczasem analizowane były cztery wybrane cukry (glukoza, fruktoza, sacharoza i maltoza), których analizę z góry zaplanowano. Do pewnego stopnia pozostawiono to jednak w domyśle, ponieważ w celach pracy nie wymieniono badanych cukrów a w tej części opracowania informacja o nich pojawiła się, ale jakby mimochodem, w nawiasie, dopiero w wersie 16. z 19., zamiast na początku podrozdziału. Zabrakło tu także podstawowej informacji w jakich jednostkach mierzono zawartość cukrów (zarówno całkowitą zawartość cukrów rozpuszczalnych jak i poszczególnych cukrów). Nie zamieszczono także informacji o liczbie powtórzeń biologicznych (czy analizowano tkanki każdej pojedynczej rośliny czy próby zbiorcze dla danego genotypu) i o liczbie powtórzeń technicznych. Dla kontrastu, w tej części pracy znalazł się bardzo szczegółowy opis modułów wysokosprawnego chromatografu cieczowego.

Na str. 30, w podrozdziale **3.6.1. Opracowanie wyników, podstawowe statystyki, normalność rozkładów oraz testowanie istotności różnic** znalazło się zdanie: „**Odrzucono odbiegające dane**”. Nie jest dla mnie jasne, jakie dane i na jakiej podstawie zostały odrzucone; proszę o wyjaśnienie.

W tej części pracy zabrakło informacji o sposobie wyliczania korelacji; podaną ją później, w rozdziale Wyniki (podrozdział 4.3., str. 39).

Na str. 31 w podrozdziale **3.6.2. Identyfikacja QTL** znalazło się kolejne niezrozumiałe dla mnie zdanie: „**Użycie tej samej skali do różnych cech umożliwiło porównanie efektów addytywnych różnych cech, gdzie piki dodatnie powyżej 1 oraz ujemne, poniżej -1 wskazują na istnienie QTL w danym locus przy $p \leq 0,05$** .” Proszę o wyjaśnienie sensu tej wypowiedzi; jaką skalę Doktorantka miała na myśli?

Mimo pewnych uchybień w opisie metodyki badań zakres zastosowanych przez Doktorantkę metod badawczych świadczy o ich dobrej znajomości, umiejętnym opanowaniu warsztatu badawczego i konsekwentnym wykorzystaniu go do założonych w pracy celów.

Omówienie rozdziału „Wyniki”

Podobnie jak przeprowadzenie doświadczeń, pomiarów i analiz, także zestawienie i statystyczne opracowanie wyników przy tak dużej liczbie danych było dla Doktorantki niemałym wyzwaniem. Pani mgr Katarzyna Cyganek zaprezentowała liczne wyniki w sposób zarówno opisowy jak i graficzny. Opis wyników został przeprowadzony bardzo skrupulatnie i drobiazgowo. Materiał dokumentacyjny ujęty w formie 15 tabel i 23 rycin opracowany został starannie i estetycznie.

Na początku rozdziału znalazł się podrozdział **4.1** (str. 32), „**Warunki pogodowe**”. To zagadnienie stanowi raczej element omówienia warunków doświadczenia i z tego względu powinno się ono znaleźć w rozdziale „**Materiał badań i metody**”. Ponadto, omówienie warunków pogodowych nie zostało wykorzystane do interpretacji wyników, nie zostało ani razu przywołane w „**Dyskusji**”.

W dalszej części rozdziału Doktorantka bardzo dokładnie, z podziałem na podrozdziały omówiła wszystkie badane parametry (elementy składowe plonu, zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie, zawartość sacharozy, glukozy, fruktozy i maltozy) z rozdzieleniem na poszczególne organy roślin a także przeanalizowała efekty międzygrupowe. To ostatnie zadanie było szczególnie trudne, wobec dużej liczby kombinacji badanych wariantów i ogromu uzyskanych danych. Tabele z wynikami dotyczącymi zawartości cukrów (**Tabela 4**, str. 36; **Tabela 6**, str. 37; **Tabela 8**, str. 39) podzielone pod względem poszczególnych organów (liść flagowy, dokłósie i kłós) były dzięki temu podziałowi bardzo czytelne. Niestety jednak podział ten jednocześnie utrudniał porównanie zawartości cukrów między poszczególnymi organami. Z tego względu przy przygotowywaniu pracy do druku może lepszą formą byłoby połączenie trzech wymienionych tabel w jedną, kosztem np. usunięcia danych na temat skośności i kurtozy. Ta uwaga ma oczywiście charakter dyskusyjny i jedynie poddaję ją pod rozwagę Doktorantce. W wymienionych powyżej tabelach, w legendzie, nie podano jednostek pomiarowych.

Istotności różnic między wartościami badanych cech (elementów składowych plonu i zawartości cukrów) form rodzicielskich zamieszczone w tabelach **Tab. 2** (str. 34), **Tab. 4** (str. 36), **Tab. 6** (str. 37), i **Tab. 8** (str. 39) zostały wyliczone przy użyciu testu t-studenta. Ponieważ analizowane grupy obejmowały po 12 lub 18 roślin, nie było spełnione kryterium statystyczne dostatecznej liczebności próby (duża próba to minimum 30 obiektów). W tym przypadku

zatem, bardziej odpowiednie byłoby zastosowanie jednego z testów nieparametrycznych.

Zdanie kończące część pracy poświęconą omówieniu zależności między badanymi cechami zamieszczone w podrozdziale 4.3.10, na str. 44 o brzmieniu: **„Charakter zależności obserwowanych w niniejszej pracy jest bardzo złożony i nietrywialny w interpretacji, co wynika w pewnej mierze z dużej liczby analizowanych cech.”** ma charakter dyskusyjny i z tego względu powinno znaleźć się w rozdziale Dyskusja. Zgadzam się z jego treścią, ale jednocześnie uważam, że Doktorantka sama nie ułatwiła sobie zadania, choć było to możliwe i wręcz wskazane, poprzez zmianę kryteriów istotności statystycznej. Dotyczy to zarówno analizy zmienności badanych cech jak i następującej po niej analizy QTL.

W pracy, do celów identyfikacji QTL przy użyciu metody CIM, przyjęto poziom istotności $LOD = 2,0$. Do wyznaczenia QTL przy użyciu metody SMA oraz do wyliczenia istotności różnic i współczynnika korelacji między cechami zastosowano poziom istotności $p < 0,05$. W większości opracowań dotyczących QTL jako wartość progowa przyjmowany jest poziom $LOD=3$ lub $LOD=2,5$. Według mnie, w omawianej rozprawie także należałoby zastosować któryś z nich (korzystniej – $LOD=3$). Podobny efekt można byłoby osiągnąć, gdyby za kryterium identyfikacji QTL posłużyła wartość współczynnika determinacji $R^2 > 10\%$, czyli taka, która przypisywana jest QTL głównym. Przyjęty dla innych testów statystycznych poziom istotności $p < 0,05$ należałoby także zmienić, na $p < 0,01$. Przyjęcie takich parametrów zwiększyłoby znacznie wiarygodność otrzymanych wyników, pozwoliłoby uniknąć konieczności analizowania i interpretacji dużej liczby mniej istotnych bądź nieistotnych szczegółów, a tym samym ułatwiłoby to pracę Autorce i odbiór dysertacji przez czytelnika.

Pomijając kwestie poziomu istotności, liczba przedstawionych w pracy QTL została zawyżona. Powodem tego było powielenie niektórych QTL, wynikające z błędnej interpretacji odczytu wskazań programu komputerowego. Win QTL Cartographer identyfikuje bowiem niekiedy QTL, rozciągający się w długim przedziale, jako dwa lub nawet trzy QTL. Wynika to najprawdopodobniej z niewystarczającej precyzji i za małej rozdzielczości mapy genetycznej. Prawidłową interpretację umożliwia prześledzenie przebiegu krzywej LOD każdej z cech i porównanie parametrów „sąsiednich” QTL. Powielone QTL mają często zbliżoną wartość LOD, podobne wartości i jednakowy znak efektu addytywnego oraz podobne wartości współczynnika determinacji R^2 . Przykładowe powtórzenia to para QDWE(C)-1D i QDWE(C)-1D.2 (**Tabela 10**,

str. 47 i *Rycina 5*) czy trójka: QDWP(C)-1A.1, QDWP(C)-1A.2 QDWP(C)-1A.3 (*Tabela 10*, str. 50 i *Rycina 3*). W związku z tym, spośród 126 QTL elementów składowych plonu 24 zostały zidentyfikowane nieprawidłowo, ze 136 QTL zawartości cukrów w liściu flagowym – 16, z 90 QTL zawartości cukrów w dokłosiu – 9, a z 86 QTL zawartości cukrów w kłosie – 14. Zatem z 438 wskazanych w pracy QTL, prawidłowo wytypowano 375. Gdyby dodatkowo podwyższyć kryterium istotności do LOD=3 otrzymalibyśmy wynik 215 QTL.

Tytuł *Tabeli 15* ze str. 112 „*Kluczowe chromosomy i regiony QTL elementów składowych plonu i zawartości cukrów w liściu flagowym, dokłosiu i kłosie populacji mapującej CSDH pszenicy*” sugeruje, że zestawione tu QTL uszeregowane będą wg chromosomów i regionów, tymczasem pierwszym kryterium w tabeli jest cecha, drugim wariant doświadczenia (inaczej - traktowanie, czyli kontrola i susza) a dopiero w trzeciej kolumnie pojawia się chromosom, a w dziewiątej i dalszych kolumnach - region. Zestawienie QTL według umownych regionów chromosomów znalazło się natomiast wcześniej, w *Tabeli 14* na str. 101. Ponieważ *Tabela 15* zawiera częściowo powielone treści można byłoby z niej zrezygnować lub połączyć z *Tabelą 14*.

Omówienie rozdziału „Dyskusja”

Dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej mgr inż. Katarzyny Cyganek. Wykonano ją bardzo rzetelnie i skrupulatnie, z kronikarską wręcz dokładnością. Widać tu zapał i wielką chęć zgłębiania badanych zagadnień. Dokładnie omówiono wyniki badań w odniesieniu do rezultatów już opublikowanych. Doktorantka nie tylko przestudiowała bogatą literaturę, ale też umiejętnie przeprowadziła analizę własnych wyników na jej tle.

Bardzo dobrym pomysłem było zestawienie danych literaturowych mających odniesienie do wyników własnych badań w tabelach. *Tabela 17* „*Markery związane z QTL kontrolującymi elementy składowe plonu i zawartość cukrów w pszenicznej populacji mapującej – porównanie z danymi literaturowymi*”, oraz *Tabela 18* i *Tabela 19*, obejmujące analogiczne zestawienia, osobno dla elementów składowych plonu i zawartości cukrów zawierają w istocie najważniejsze informacje w aspekcie poznawczym i aplikacyjnym. Wskazują bowiem markery sprzężone z istotnymi cechami, zarówno w badanej - jak też innych populacjach mapujących pszenicy. Mogą one zatem stanowić przedmiot dalszych szczegółowych analiz jako geny kandydujące i znaleźć zastosowanie w selekcji wspomaganey markerami (MAS).

W dwóch przypadkach, w *Tabeli 17*, w miejsce symboli markerów o nieznannej funkcji powinny zostać wstawione markery funkcjonalne, które wykazywały pełne sprzężenie z wytypowanym markerem „niespecyficznym”. Dotyczyło to *locus Aba8* (1A), sprzężonego z *Xpsr2019* i *locus VrnA1* (5A) odpowiadającego markerowi *Xpsr575.2*.

W „*Dyskusji*” należałoby podkreślić związek tych genów ze zidentyfikowanymi QTL. Warto byłoby także wskazać i omówić kilka innych powiązań między wykrytymi w pracy QTL a markerami funkcjonalnymi. Chodzi o **1)** gen strukturalny glukozy *Glu-A1* (1A) sprzężony z *QDWP12D*, **2)** gen *Aba8* (1B) sprzężony z *QWSC12D* i **3)** gen *Aba12* (2B) odpowiadający markerowi *Xpsr1870*, sprzężony z *QDWE12D*, *QMAL10C* i *QSUC12C*.

Mimo dokładnej analizy bibliograficznej oczywistym jest, że wśród cytowanej w pracy literatury mogło zabraknąć kilku pozycji. Nieco dziwny jest jednak fakt, że w „*Dyskusji*” nie pojawiły się odniesienia do wyników własnych badań prowadzonych na populacji CSDH. Mam na myśli pracę: *Czyczyło-Mysza I, Marcińska I, Skrzypek E, Cyganek K, Juzoń K, Karbarz M. 2014. QTL mapping for germination of seeds obtained from previous wheat generation under drought Cent. Eur. J. Biol. 9(4):374-382, DOI: 10.2478/s11535-013-0273-y. Aby nadrobić to przeoczenie proszę o omówienie podczas obrony pracy doktorskiej roli i funkcji genu Rht-B1 (4B), który został wskazany zarówno w przywołanej powyżej pracy jak i w omawianej dysertacji, jako marker sprzężony z QTL różnych cech.*

Omówienie części „Podsumowanie i Wnioski”

Punkty **nr 4, 6 i 7** z racji błędnej identyfikacji QTL (co wyjaśniono w omówieniu rozdziału „*Wyniki*”) zawierają nieprawidłowe liczby QTL.

Punkt **nr 8** zawiera sformułowanie: „*[...] badane cechy znajdują się w dużej mierze pod kontrolą wspólnych obszarów genomu pszenicy*”. Powinno ono brzmieć: „*[...] badane cechy znajdują się w dużej mierze pod kontrolą genów zgrupowanych we wspólnych obszarach genomu pszenicy*”.

Punkt **nr 10** stanowi, iż „*Wśród markerów molekularnych sprzężonych z badanymi cechami wskazano te, które mogą być przydatne do selekcji odmian pszenicy tolerancyjnych na stres suszy glebowej.*” Punkt ten powinien być opatrzony dopiskiem – *Tab. 17-19* (zwłaszcza, że zestawienie markerów znalazło się nie w rozdziale „*Wyniki*” ale dość nietypowo - w rozdziale „*Dyskusja*”).

Informacja zawarta w punkcie **nr 11** budzi pewne wątpliwości. Wprawdzie populacja CSDH posłużyła do zbadania genetycznego podłoża zawartości cukrów

oraz ich związku z elementami składowymi plonu, ale nie oznacza to, że jest ona „dobrym modelem”. Wątpliwości budzi tu niezbyt duża liczebność tej populacji, co może wpływać na zmniejszenie precyzji mapowania QTL.

PODSUMOWANIE

Zasadniczym walorem pracy było kompleksowe podejście do analizy zawartości cukrów w populacji mapującej pszenicy zwyczajnej w kontroli i w suszy, co umożliwiło ocenę zróżnicowania zawartości badanych związków nie tylko w różnych warunkach środowiska, ale także w różnych organach rośliny.

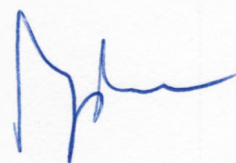
Głównym osiągnięciem stanowiło wykrycie stabilnych QTL badanych cech, potwierdzenie ich wiarygodności przez analizę danych literaturowych i wskazanie *loci* o ewentualnych efektach plejotropowych. Warty podkreślenia jest to, że wykonane badania miały nie tylko charakter poznawczy, ale także aplikacyjny, gdyż wskazywały na powiązania zawartości cukrów z cechami plonotwórczymi i pozwoliły wytypować markery molekularne potencjalnie przydatne w MAS.

WNIOSEK KOŃCOWY

Praca Katarzyny Cyganek obejmowała szeroki zakres zagadnień i napisana została z dużą biegłością i starannością. Na wszystkich etapach realizacji badań i przygotowania treści rozprawy Doktorantka wykazała się dobrą znajomością omawianej tematyki badawczej, dużymi umiejętnościami i dojrzałością naukową. Pewną słabością rozprawy było zbyt drobiazgowość podejście do opisu wyników. Bardziej syntetyczne opracowanie rezultatów poprawiłoby jakość i odbiór pracy. Wskazane uchybienia merytoryczne nieznacznie umniejszają walory naukowe niniejszego opracowania. Mimo zawartych w recenzji uwag krytycznych całą pracę oceniam pozytywnie.

W związku z powyższym wnoszę do Rady Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Katarzyny Cyganek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 28 sierpnia 2018



dr hab. Beata Myśków, prof. nadzw.

