



Wrocław 27.05.2024

Recenzja

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Bartosza Nowaka pt. „**Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej *Zea mays***” wykonanej w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, pod kierunkiem Prof. UPP dr hab. Agnieszki Tomkowiak.

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. Andrzeja Bleharczuka – Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w oparciu o pismo RNDRIO-14/4000/2024 z dnia 15.04.2024. Pismo to zawierało informację o powołaniu mojej osoby na recenzentkę rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Bartosza Nowaka. Przewód został wszczęty w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

Praca została zaprezentowana w formie cyklu czterech publikacji z opisem licząca 147 stron. Prace opublikowane zostały w recenzowanych czasopismach w latach 2022-2023. Opis cyklu publikacji zawiera niezbędne elementy formalne jak wykaz publikacji, spis treści oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wykorzystane w pracy cztery publikacje osiągnęły sumaryczną punktację MNiSW 380 punktów i łączny współczynnik wpływu Impact Factor wg Journal of Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania 12,6. Na cykl publikacji składały się:

1. Nowak B., Tomkowiak A., Bocianowski J., Sobiech A., Bobrowska R., Kowalczewski P., Bocianowska M., 2022. The Use of DArTseq Technology to Identify Markers Linked to Genes Responsible for Seed Germination and Seed Vigor in Maize. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>. Punktacja MNiSW (2021): 140 IF (2021): 5,600
2. Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Sychała J., 2022. The use of DArTseq technology to identify new SNP and SilicoDArT markers related to the yield-related traits components in maize. *Genes*, vol. 13 (iss. 5), art. 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>. Punktacja wg MNiSW (2021): 100 IF (2021): 3,5



3. Nowak B., 2023. Wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. *Fragm. Agron.* 40(1) 2023, 25–32; doi: 10.26374/fa.2023.40.3. Punktacja MNiSW (2022): 40

4. Nowak B., Tomkowiak A., Sobiech A., Bocianowski J., Kowalczewski P. Ł., Spychała J., Jamruszka T.. 2024. Identification and analysis of candidate genes associated with yield structure traits and maize yield using next-generation sequencing technology. *Genes* vol. 15 (iss. 1), art. no. 56 ; <https://doi.org/10.3390/genes15010056>. Punktacja MNiSW (2023): 100 IF (2023): 3,5

Recenzja przedłożonej pracy skupiała się będzie na przygotowanym przez doktoranta opracowywaniu wyżej wymienionych publikacji i ich doborze w celu stworzenia spójnej tematycznie pracy doktorskiej.

Rozprawa doktorska magistra Nowaka miała na celu identyfikację nowych markerów molekularnych sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków oraz wczesny wigor kukurydzy, wykorzystując dane pochodzące z sekwencjonowania nowej generacji. Wybrany do opracowania cel badawczy jest jednym z najważniejszych problemów badawczych dla osiągnięcia postępu hodowlanego gatunków uprawnych. Współczesna hodowla kukurydzy, jako gatunku dynamicznie powiększającego zajmowany areal uprawy, jest procesem w którym niezbędne jest wykorzystanie informacji o genomie materiałów wyjściowych. Uzyskanie postępu hodowlanego na odpowiednim poziomie zapewnia wykorzystanie technik badawczych pozwalających na prowadzenie selekcji niezależnej od wpływów środowiska zewnętrznego. Skuteczna i szybka selekcja materiałów wyjściowych, zwłaszcza w przypadku odmian heterozyjnych, jest kluczowa dla otrzymania odmian o wysokim potencjale plonotwórczym jak również o wysokiej jakości plonu. Zastosowanie metod opartych na analizach genomu daje takie możliwości. Uzyskanie dużej liczby markerów na odpowiednio dobranej populacji pozwala na identyfikację markerów molekularnych sprzężonych z genami warunkującymi najważniejsze cechy fenotypowe. Rozwój technik otrzymywania markerów DNA opartych na technice sekwencjonowania nowej generacji takich jak GBS czy DArTseq dostarcza bardzo dużej ilości danych, których poprawna analiza pozwala ustalić regiony odpowiedzialne za cechy takie jak odporności na patogeny czy wysokość plonu. Poszukiwanie markerów do selekcji pod kątem wybranych cech ma bardzo



duże znaczenia dla przyspieszenia procesów hodowlanych ale nie mniejsze znaczenie ma obecnie dobór form rodzicielskich pod względem zróżnicowania genetycznego. Wobec zawężenia genetycznego materiałów wykorzystywanych w firmach hodowlanych niezbędne jest określenie poziomu ich zróżnicowania czy też podobieństwa. Stworzenie zestawu markerów pozwalających na określenie przynależności do grup heterotycznych i oceny zróżnicowania genetycznego form rodzicielskich są czynnikami pozwalającymi na uzyskanie satysfakcjonującego efektu heterozji.

Wobec powyższego wybranie tej tematyki badań uważam za ważne i uzasadnione.

Tytuł rozprawy doktorskiej „Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej *Zea Mays*” nie w pełni odpowiada zakresowi prowadzonych a następnie opisanych w dysertacji badań. W przedstawionej dysertacji nie wynika „wielowymiarowość” analiz wpisana w tytule. Poza analizą zmiennych kanonicznych jako statystycznej metody wielowymiarowej nie ma tu w mojej opinii wielowymiarowych analiz mechanizmów.

Autor podzielił opracowanie na 11 rozdziałów: Streszczenie i słowa kluczowe, Summary and Keywords, Wstęp, Hipotezy badawcze i cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej, Materiał roślinny i metodyka badań, Wyniki, Podsumowanie, Wnioski, Spis Literatury, Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych oraz Artykuły naukowe wchodzące w skład zbioru. Struktura pracy jest poprawna chociaż poszczególne nazwy rozdziałów (rozd. 3 czy rozdz. 10) mogły by zostać skrócone dla większej przejrzystości spisu treści.

Streszczenie oraz Wstęp syntetycznie wprowadzają czytelnika w tematykę badań. Opisane znaczenie gatunku *Zea mays*, arealu i dynamiki jego zmian w Polsce i na Świecie uzasadniają ważność podjętych badań. Przedstawiony został rozwój priorytetów w hodowli kukurydzy jak również konieczność stosowania metod biotechnologicznych z mocnym naciskiem na metody analizy DNA. Doktorant przedstawił najważniejsze metody wykorzystywane do analiz DNA i możliwości zastosowania danych uzyskanych za ich pomocą do mapowania asocjacyjnego całego genomu czy też mapowania asocjacji genów



kandydujących. Podejścia te umożliwiają poznanie i analizę architektury genetycznej złożonych cech. Opisany został również stan wiedzy dotyczący poszukiwania markerów związanych z genami zwiększającymi produktywność i lokalizowaniem loci determinujących ważne użytkowo cechy ilościowe. Autor opracowania zasygnalizował również inne przydatne w pracy nad poznaniem gatunku metody takie jak selekcja genomowa i podstawowe metody statystyczne do jej opracowania. Przy opisie ww metod wkraść się błąd odnośnie nazwy metody : BLUP (Best Linear Unbased Prediction) to Najlepsza a nie najbliższa liniowa nieobciążona predykcja. Przedstawione wprowadzenie do pracy w postaci trzech pierwszych rozdziałów przygotowane zostało na podstawie dobrze dobranej najnowszej literatury i jest wystarczające dla zaprezentowania biegłości poruszania się w temacie. W trakcie przygotowania nie udało się uniknąć drobnych błędów takich jak: nie ujednoczenie tłumaczenia słowa kukurydza, w streszczeniu mamy maize w pracach corn czy niekonsekwencja w stosowaniu skrótów ton/ha wymiennie z t/ha.

Rozdział Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej i wyczerpująco przedstawia założenia dysertacji. Hipotezy badawcze są poprawne poza hipotezą czwartą. Stwierdzenie, iż wykorzystanie najnowszych technik biologii molekularnej pozwoli na ograniczenie czasu i kosztów wyhodowania nowych odmian kukurydzy jest nie możliwe do zweryfikowania na podstawie badań przedstawionych w pracy. Nie może owe stwierdzenie stanowić hipotezy dysertacji. Sugerowałabym również unikania odwołań do hipotezy w stawianiu hipotez.

W części Materiał roślinny i metody badań zawiera bardzo lakoniczny opis materiałów hodowlanych użytych w badaniach. Materiał stanowiło łącznie 329 genotypów kukurydzy z dwóch spółek hodowlanych Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o. Badane były 250 linii wsobnych, 122 mieszańce oraz 20 genotypów referencyjnych dobrze i słabo plonujących. Ostatnie sformułowanie nie jest w pracy wyjaśnione i nasuwa szereg pytań o sposób wyboru form referencyjnych. Zamieszczenie szerszego i bardziej szczegółowego opisu np. w formie tabelarycznej analizowanego materiału ułatwiłoby czytelnikowi odbiór pracy.



W podrozdziale Metodyka badań autor rozpoczyna od opisu fenotypowania przedstawionego w poszczególnych publikacjach. W publikacji 1 ocenie poddawano zdolność i energię kiełkowania ziarniaków oraz test wigoru siewek w warunkach laboratoryjnych i w warunkach polowych. W publikacjach 2 i 4 ocenie poddano: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów ziarna, liczba ziaren w rzędzie, masa tysiąca ziaren (MTZ) oraz plon. Dalsze podrozdziały opisują izolację DNA przy użyciu zestawów do izolacji; Genotypowanie z wykorzystaniem technologii DArTseq; Analizy statystyczne i mapowanie asocjacyjne które obejmowały: wpływ interakcji linii oraz lokalizacji na zmienność badanych cech, charakter rozkładu obserwowanych cech przeanalizowano za pomocą testu Shapiro-Wilka, sprawdzono czy spełnione są założenia wymagane do przeprowadzenia analizy wariancji a nie jak napisano w pracy czy analiza wariancji spełnia założenia. Zastosowano grupowanie linii metodą UPGMA. Zastosowano również metody statystyczne takie jak analiza zmiennych kanonicznych czy odległości Mahalanobisa. Wykonano mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem analizy GWAS na podstawie wyników opisanych wcześniej fenotypowania i genotypowania. Kolejnym podrozdział opisuje procedurę mapowania fizycznego, analizę funkcjonalną sekwencji genów oraz projektowanie starterów dla zidentyfikowanych markerów sprzężonych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem siewek i cechami struktury plonu i plonem kukurydzy, zastosowaną przy opracowaniu wyników przedstawionych w publikacjach 1,2 i 4. Ten fragment pracy zawiera zbyt duże rozdrobnienie na podrozdziały, tytuły podrozdziałów są bardzo długie i niepotrzebnie zostały wyszczególnione. Ostatnie dwa podrozdziały rozdziału piątego zawierają opis identyfikacji wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami. Opis metodyki zawiera nieścisłości i błędy takie jak: niepoprawne zapisy jednostek: stopni Celsjusza, położenia geograficznego, niejednorodny symbol dzielenia w jednostkach czy podanie nazwy odczynnika firmy która nie istnieje od 2010, które może wprowadzać czytelnika w błąd.

Rozdział Wyniki jest najbardziej rozbudowana częścią dysertacji. Zawiera opis uzyskanych w poszczególnych publikacjach wyników w sposób klarowny i spójny i pozwala się zorientować w przeprowadzonych badaniach.



Pierwszy akapit tego rozdziału powinien jednak znaleźć się w rozdziale Metodyka ponieważ zawierają brakujący opis założonych doświadczeń polowych a nie wyniki prac. Dalsza część dokładnie i jasno przedstawia uzyskane podczas prac wyniki doświadczeń polowych, analiz fenotypowych opisanych w publikacji 1, 2 i 4. Opisane wyniki genotypowania i mapowania asocjacyjnego oraz projektowania starterów nie budzą zastrzeżeń. W publikacji 1 dzięki zastosowaniu techniki NGS uzyskano ponad 81 tysięcy markerów spośród których końcowo wybrano 20 najbardziej istotnych dla zdolności kiełkowania ziarniaków i wigoru. Spośród wytypowanych 20 sześć markerów zlokalizowanych było w genach. W publikacji drugiej tą samą bazę wyników NGS korelowano z cechami struktury plonu i z plonem i wybrano 16 markerów do dalszych analiz. W publikacji 4 z uzyskanych 92 614 markerów wybrano 20 związanych z cechami takimi jak plon, masa ziarna z kolby, średnica rdzenia, liczba rzędów ziarniaków i liczba ziaren w rzędzie. Określono lokalizację 19 z 20 wytypowanych markerów i dla tych wybranych zostały zaprojektowane przedstawione w pracy startery. Na podstawie wyników stwierdzono dwa markery polimorficzne dla genotypów referencyjnych. Marker 28629i marker 29294, położenie markerów na chromosomach skłania autora do przeprowadzenia dalszych testów na osobnikach skrajnych. Po raz kolejny w pracy nie znamy kryteriów doboru form referencyjnych.

Opis markerów powiązanych z analizowanymi cechami znajduje się w tabelach. Ich tytuły zostały zmienione względem oryginalnych tytułów tabel zawartych w publikacjach. W opisie wyników zachowane zostały jednolite odnośniki do rysunków/figur co obniża czytelność pracy. Błędnie został również podpisany elektroforogram, nie elektroferogram, oznaczony jako Rycina 1, omyłkowo zapewne wpisany został inny numer markera.

W publikacjach 2 i 4 przeprowadzono również oszacowanie podobieństwa genetycznego pomiędzy analizowanymi 186 liniami w przypadku publikacji 2 i 188 genotypów w publikacji 4. Analiza utworzonych dendrogramów pozwoliła stwierdzić, iż linie pochodzące ze Smolic wykazywały do siebie większe podobieństwo niż do linii z MHR i odwrotnie (Publikacja 2) oraz wyraźny podział linii na dendrogramie z publikacji 4 na grupy powiązane z pochodzeniem ze spółek hodowlanych.



Przeprowadzona dyskusja wyników publikacji 1, 2 i 4 w rozdziale Podsumowanie umożliwiła dostrzeżenie rozwoju koncepcji badawczej u Autora. Wnioski wyciągnięte z każdej poprzedniej pracy pozwoliły na udoskonalanie metodyki kolejnej. Świadczy to o dojrzałości naukowej Doktoranta. Nasuwa się pytanie czy publikacja 3 nie zaburza spójności tematycznej artykułów. Publikacja 3 przez Doktoranta została wspomniana jeden raz we wstępie i jeden raz w podsumowaniu i jej obecność w składzie publikacji do rozprawy niczego nie wnosi. Wykonane i opisane badania z publikacji 1,2 i 4 zawierają spójną koncepcję i wysoki poziom naukowy. Przedstawione w tych trzech pracach wyniki pozwoliły na zrealizowanie celów wyznaczonych dla tej rozprawy doktorskiej.

Całość zaprezentowanych badań doprowadziła do wysnucia 10 wniosków końcowych. Stwierdzono m.in. Zidentyfikowanie nowych markerów molekularnych sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor siewek. Wnioski dotyczą również możliwości wykorzystania praktycznego w hodowli wytypowanych markerów do selekcji jak również możliwość wykorzystania markerów do podziału na grupy heterotyczne przy wyborze komponentów rodzicielskich do krzyżowań.

Rozprawa zawiera również spis literatury, kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów.

Wyszczególnione w recenzji nieścisłości nie wpływają na obniżenie wartości naukowej pracy. W mojej opinii praca doktorska mgr inż. Bartosza Nowaka spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2021 r., poz. 478) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.