

dr hab. inż. Tomasz Warzecha, prof. URK
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Ul. Łobzowska 24, 31-140 Kraków

Kraków, 28.04.2024 r.

Recenzja

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

Recenzję wykonano na zlecenie prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka – Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w oparciu o pismo RNDRIO-13/4000/2024 z dnia 15.04.2024. Pismo to zawierało informację o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Bartosza Nowaka.

Pan mgr inż. Bartosz Nowak jest absolwentem Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wydziału Przyrodniczo-Technologicznego, kierunku Rolnictwo, specjalności Agronomia, gdzie w 2019 roku uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera. W trakcie studiów Pan mgr inż. Bartosz Nowak pracował w Biurze Doradztwa Rolniczego w Kobylinie w latach 2015-2016 oraz w firmie Limagrain Central Europe gdzie w latach 2016-2020 był technikiem doświadczalnym prowadząc doświadczenia z kukurydzą i rzepakim ozimym. Od 2020 roku pracuje jako hodowca w firmie Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR. Jest autorem 7 publikacji, sześć z nich opublikowano w czasopiśmie z listy JCR. W trzech artykułach Doktorant jest pierwszym autorem, w grupie tych prac znajdują się artykuły wykorzystane do przygotowania rozprawy doktorskiej. Dotychczas nie ubiegał się o nadanie stopnia doktora.

Rozprawa doktorska mgr inż. Bartosza Nowaka dotyczy możliwości wykorzystania metod biotechnologicznych oraz markerów molekularnych do wyjaśnienia mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy. Mamy tu istotny aspekt poznawczy ale również aplikacyjny. Dzięki postępowi biologicznemu można wprowadzać do uprawy odmiany o wyższym potencjale plonowania wynikającym z poprawy wydajności wieloaspektowych procesów plonotwórczych (na poziomie komórkowym, tkankowym oraz organów roślinnych) i lepszym wykorzystaniu nakładów na agrotechniczne czynniki produkcji. W takim razie możemy traktować prace Pana Magistra jako bardzo istotny element ekologiczny w tworzeniu ogólnego postępu rolniczego poprzez promowanie postępu biologicznego w produkcji roślinnej. To bardzo podnosi wartość przedstawionego do recenzji autoreferatu bazującego na cyklu czterech publikacji.

Kandydat trafnie wybrał do testowania hipotez badawczych kukurydzę jako bardzo istotny gatunek roślin użytkowych, będący grupie czterech gatunków żywiących świat (dostarczających człowiekowi ponad 60% białka i energii). To kolejny dowód na duże znaczenie tego gatunku w aspekcie społecznym i ekologicznym a przed postępowaniem biologicznym w branży hodowlanej i nasiennej kukurydzy staje ogromne wyzwanie dopasowania uprawianych odmian kukurydzy do wymagań społecznych, rynkowych oraz do zmieniających się warunków środowiskowych (np. globalne ocieplenie i okresy suszy).

Obecnie w hodowli kukurydzy wykorzystywane są różnorodne techniki badawcze bazujące na genetyce molekularnej, dzięki nim możliwe jest identyfikowanie regionów genomu związanych w ważnymi cechami użytkowymi roślin jak np. plon i jego jakość. Kandydat zastosował do testowania swoich hipotez badawczych bardzo dobrze dobraną metodykę z zakresu fenotypowych badań polowych, laboratoryjnych, bioinformatycznych i statystycznych a wyniki badań zostały dobrze udokumentowane.

Efekty swoich badań Pan mgr inż. Bartosz Nowak opublikował sam bądź wraz z współautorami w następujących artykułach:

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.* vol. 23(23), <https://doi.org/10.3390/ijms232314865>. (IF 2021: 5,600; Punktacja MEiN: 140)

2. Tomkowiak A., Nowak B., Sobiech A., Bocianowski J., Wolko Ł., Spychała 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(5), <https://doi.org/10.3390/genes13050848>. (IF 2021: 3,500; Punktacja MEiN: 100)

3. Nowak B., 2023. Wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. *Fragm. Agron.* 40(1) 2023, 25–32, doi: 10.26374/fa.2023.40.3. (IF 2022: brak, Punktacja MEiN: 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 (1), <https://doi.org/10.3390/genes15010056>. (IF 2023: 3,5; Punktacja MEiN: 100)

Sumaryczny IF prac Kandydata wchodzących w skład rozprawy to 12,60, natomiast sumaryczna liczba punktów ministerialnych (wg roku opublikowania) to 380. Pozostały dorobek publikacyjny Pana mgr inż. Bartosza Nowaka to prace w trzech czasopismach z listy JCR (dwie prace w *International Journal of Molecular Sciences* 2022 oraz 2023 i *Agriculture* 2022) o łącznej punktacji MEiN 380 oraz IF 14,8.

Chciałbym tu uwypuklić, że większość prac została opublikowana w prestiżowych czasopismach znajdujących się w wykazie JCR i posiadają wysokie współczynniki wpływu. Ponadto prace te przeszły proces estymacji przez recenzentów wybranych przez redakcje czasopism będących profesjonalistami w danej dziedzinie. Stąd też w swojej recenzji chciałbym skupić się na układzie rozprawy doktorskiej i spójności prezentowanego w każdym artykule tematu jako rozwiązanie ogólnego problemu badawczego.

Hodowla roślin to nauka zajmująca się interpretacją i wykorzystaniem zjawisk genetycznych w celu modelowania właściwości biologicznych roślin ale jest to też działalność prowadząca do wygenerowania i utrzymania nowych odmian roślin uprawnych. Pan mgr. inż. Bartosz Nowak podjął się trudnego zadania identyfikacji skutecznych markerów molekularnych lub regionów QTL sprzężonych z plonowaniem kukurydzy, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania ziarniaków i wczesnym wigorem kukurydzy w oparciu o techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS) w połączeniu z mapowaniem asocjacyjnym i fizycznym. Już tak zarysowane cele badawcze sugerują aspekt poznawczy i aplikacyjny przedstawionego cyklu badawczego. Ale dodatkową wartością aplikacyjną podjętych analiz molekularnych jest potencjalne wykorzystanie zidentyfikowanych markerów SilicoDart i SNP do ustalenia stopnia genetycznego podobieństwa linii wsobnych w sytuacji gdy brak informacji na temat pełnego rodowodu linii lub informacje są fragmentaryczne, a dzięki temu można będzie ograniczyć koszty związane z krzyżowaniem diallelicznym i badaniem specyficznej wartości kombinacyjnej (SCA). Wytypowane nowe specyficzne markery molekularne mogą

być następnie potencjalnie wykorzystane we wstępnej selekcji form wyjściowych do krzyżowań i prac hodowlanych. Dodatkowe cele badawcze to: 1. mapowanie fizyczne, które polega na podaniu rzeczywistej pozycji zidentyfikowanych markerów i genów które są z nimi sprzężone, 2. charakterystyka wytypowanych genów kandydujących determinujących plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy, 3. projektowanie starterów służących do identyfikacji wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami cech użytkowych jak plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.

Poznanie związku pomiędzy loci cech ważnych gospodarczo a markerami cech użytkowych może pomóc w trafniejszym wyborze osobników do dalszych etapów hodowli. Stąd też dużą zaletą podjętego przez Pana mgr inż. Bartosza Nowaka problemu badawczego jest nie tylko jego aspekt poznawczy ale i praktyczny.

Wykorzystanie technik molekularnych w badaniach wspomagających hodowlę kukurydzy jest realizowane w dwu dużych obszarach. Pierwszy obszar to techniki analizy genomu oparte o sekwencje DNA, a drugi obszar to techniki z zakresu inżynierii genetycznej prowadzące do zwiększenia zmienności genetycznej kukurydzy. Tworzenie organizmów transgenicznych w oparciu o techniki molekularne daje możliwość tworzenia nowych kreacji genetycznych i transferu genów z nawet odległych jednostek systematycznych do kukurydzy jak np. gen kodujący syntazę EPSPS rozkładająca glifosat, który pochodzi z bakterii *Salmonella* spp.

Natomiast postępy w dziedzinie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) genomów umożliwiły wykorzystanie tej techniki do poznania sekwencji DNA wielu roślin uprawnych w tym kukurydzy. W grupie tych technik Kandydat przytacza pirosekwencjonowanie 454, technika Solex, platforma SOLiD, Polonator czy HeliScope Single Molecule Sequencer. Doktorant opisuje również rozwój technik sekwencjonowania z wykorzystaniem systemu Illumina które dały początek m.in. technologii DArTseq, która została wykorzystana w przedstawionym do recenzji cyklu badawczym. W technice DArTseq dzięki zastosowaniu trawienia restrykcyjnego uzyskuje się krótsze odcinki które następnie dają krótsze odczyty co zmniejsza złożoność genomu i ułatwia analizy. Dzięki technice DArTseq można uzyskać dwa zbiory danych, a mianowicie ten zawierający markery dominujące oraz drugi zawierający markery kodominujące z zaznaczonymi polimorfizmami SNP (single nucleotide polymorphism). W metodzie tej możliwe jest uzyskanie nawet trzykrotnie więcej markerów dominujących niż klasyczna DArT, co podnosi też wartość recenzowanej pracy gdyż Kandydat w badaniach własnych zastosował technikę DArTseq. Technologia DArT była wykorzystana w wielu programach hodowlanych do selekcji komponentów do krzyżowań natomiast technika DArTseq nie była dotychczas często stosowana do analizy rodzimych materiałów hodowlanych kukurydzy. Ten fakt jest dowodem na nowatorskie podejście do tematu badawczego i podnosi wartość badań Kandydata.

Dane wygenerowane dzięki wspomnianym technikom pozwalają na identyfikacje regionów genomu powiązanych z cechami fenotypowymi w tym z cechami ilościowymi jak plon i jego jakość. Kolejne ważne narzędzie badawcze wymieniane przez Doktoranta to mapowanie asocjacyjne, które było możliwe dzięki zastosowaniu nowych technologii sekwencjonowania do poznania referencyjnego genomu kukurydzy. Badania asocjacyjne całego genomu (GWAS) umożliwiły analizę zmienności genetycznej oraz identyfikację związku pomiędzy cechą a podstawową zmiennością genetyczną poprzez wykorzystanie historycznych zdarzeń rekombinacji. W dalszej części Kandydat przybliży nam typy mapowania asocjacji czyli mapowanie asocjacji całego genomu (GWAS) oraz mapowanie asocjacji genów kandydujących. Kukurydza jest gatunkiem obcopolnym, co w dużym stopniu determinuje skład genetyczny populacji, cechuje się ona dużą heterozygotycznością a genom kukurydzy jest wysoce polimorficzny. W oparciu o metody biologii molekularnej wykryto i zlokalizowano loci determinujące cechy użytkowe kukurydzy jak plon i cechy struktury plonu, a regiony QTL

związane z plonem i jego komponentami są rozlokowane w całym genomie na różnych chromosomach. Zastosowanie markerów molekularnych w selekcji pozwoliłoby na precyzyjne typowanie roślin do dalszych prac hodowlanych.

Poza selekcją w oparciu o markery (MAS) w hodowli kukurydzy stosowana jest również selekcja genomowa (SG), a podstawą tej metody jest bardzo dokładne fenotypowanie roślin, np. linii kukurydzy, a następnie wykorzystanie metod statystycznych i bioinformatycznych z gruntowną wiedzą na temat genomów roślin. W oparciu o różne parametry oblicza się genomową szacunkową wartość hodowlaną (GEBV) im jest ona wyższa tym bardziej wartościowy jest komponent do krzyżowania. Metody statystyczne przydatne w tego typu opracowaniach to liniowa nieobciążona predykcja (BLUP), RR BLUP (z zastosowaniem regresji), GBLUP czy metoda Bayesian.

Bardzo ważnym kierunkiem rozwoju analizy genomu kukurydzy poza identyfikacją nowych markerów oraz regionów QTL, jest poszukiwanie metod doboru komponentów rodzicielskich do hodowli heterozyjnej. Klasyczne podejście opiera się na badaniu ogólnej wartości kombinacyjnej linii (GCA) i specyficznej wartości kombinacyjnej (SCA). W tym drugim kierunku istotne jest wykrycie związku pomiędzy plonem mieszańca F1 a heterogennością loci-markerów jego form rodzicielskich. Wykazanie takiego związku byłoby bardzo pomocne dla hodowli heterozyjnej gdyż mogło by ograniczyć kosztowne procedury empiryczne jak np. krzyżowanie w układach diallelicznych.

Podsumowując powyższe stwierdzenia, myślę że podjęcie badań mających na celu wytypowanie a następnie wykorzystanie nowych markerów molekularnych do wstępnej selekcji komponentów rodzicielskich do krzyżowań i dalszych prac hodowlanych jest wysoce uzasadnione biorąc pod uwagę zarówno aspekty poznawcze jak i możliwości aplikacji uzyskanych wyników w praktycznej hodowli kukurydzy.

Ocena i uwagi dotyczące poszczególnych rozdziałów

W przedstawionej do recenzji pracy znajdują się wszystkie elementy typowe dla rozpraw doktorskich zatem spełnia ona wymagania formalne i merytoryczne stawiane tego typu opracowaniom. Obejmuje ona 147 stron druku, a tekst uzupełnia 6 tabel, oraz 4 ryciny, które rzetelnie obrazują wykonane doświadczenia, choć są tylko skondensowaną formą wykonanych badań. Praca opiera się na cyklu 4 publikacji które są dostępne w całości na stronach 83-147 i w pracach tych możemy znaleźć szczegółowe opracowania tabelaryczne oraz ryciny. W toku wywodu Autor cytuje 119 pozycji literatury. Recenzowana rozprawa doktorska została napisana w sposób staranny i przejrzysty.

Rozprawę doktorską otwiera „Wykaz artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru”, a następnie „Wykaz pozostałych artykułów naukowych, nie wchodzących w skład zbioru” oraz dane naukometryczne. Dalej spis treści, po którym Autor umieścił „Streszczenie i słowa kluczowe” w języku polskim i angielskim.

W rozdziale 3. „Wstęp” liczącym 7,5 strony Autor zawarł informacje na temat wyzwań stojących przed hodowlą kukurydzy, możliwością zastosowania metod molekularnych w selekcji materiałów hodowlanych, oraz typowania komponentów rodzicielskich do hodowli heterozyjnej. W rozdziale tym Kandydat opisuje metody sekwencjonowania nowej generacji (NSG), selekcję genomową oraz metody statystyczne wykorzystywane do obliczenia współczynnika genomowej szacunkowej wartości hodowlanej (GEBV). Rozdział ten w bardzo logicznym wywodzie przybliży czytelnikowi problemy hodowli roślin związane z selekcją poligenicznych cech użytkowych i interakcji genotypu z szeroko pojętym środowiskiem. Został on opracowany starannie i wnikliwie, uwzględniając przykłady zastosowania metod sekwencjonowania nowej generacji i możliwością generowania markerów molekularnych metodami DArT i DArTSeq w analizie różnorodności genetycznej i struktury populacji różnych grup roślin użytkowych.

Kandydat prawidłowo i jasno przedstawił hipotezę badawczą i cel pracy doktorskiej, ta pierwsza zakłada możliwość wykorzystania technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS) połączonych z mapowaniem asocjacyjnym i fizycznym do identyfikacji skutecznych markerów molekularnych lub regionów QTL sprzężonych z plonem, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem kukurydzy.

Doktorant zaprezentował sześć celów szczegółowych, które pogrupowałbym w następujące obszary:

1. Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji (NGS) do wygenerowania markerów molekularnych SilicoDArT i SNP a na ich podstawie określenie stopnia spokrewnienia pomiędzy analizowanymi genotypami kukurydzy

2. Identyfikacja powyższych typów markerów sprzężonych z genami wybranych cech użytkowych (plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków, wczesny wigor kukurydzy), mapowanie fizyczne genów i sprzężonych z nimi markerami oraz charakterystyka wytypowanych genów kandydujących

3. Projektowanie starterów służących do wykrycia wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi determinującymi wybrane cechy użytkowe kukurydzy (plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków, wczesny wigor) oraz zastosowanie reakcji PCR do testowania wybranych markerów w referencyjnych genotypach kukurydzy. Cel pracy koresponduje z tematem pracy, założeniami metodycznymi oraz wnioskami.

Kolejny rozdział „Materiał roślinny i metodyka badań” przedstawiony na str. 19-24 został podzielony na dwa podrozdziały. W pierwszym znajdujemy obszerny opis materiału roślinnego jakim były 392 genotypy kukurydzy, w tym 250 linii wsobnych, 122 mieszańce F1 oraz 20 genotypów referencyjnych dobrze i słabo plonujących. Materiał ten został wykorzystany do przygotowania publikacji 1,2,4. Analizowany materiał roślinny pochodził z dwu firm hodowlanych: 1. Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, 2. Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o. o. Ponadto linie posiadały dwa typy ziarna flint i dent i pochodziły z różnych rejonów geograficznych (Francja, Hiszpania oraz USA), co daje możliwość przebadania większej puli genowej, tu należy podkreślić i pochwalić trafny dobór materiału do badań.

Metody doświadczalne zostały opisane w podrozdziale 5.2. bardzo wyczerpująco, począwszy od metod fenotypowania (5.2.1.), w publikacji 1 (ocena zdolności kiełkowania, energii kiełkowania, żywotności ziarniaków, test wigoru siewek, oraz w warunkach polowych wielkość wschodów, szybkość i jednorodność). Następnie w publikacji 2 i 4 znajdujemy wyniki oceny fenotypowej takich cech jak: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów ziarna, liczba ziaren w rzędzie, masa tysiąca ziaren (MTZ) oraz plon. Doświadczenia zostały założone w adekwatnych układach doświadczalnych pozwalających na eliminację błędu doświadczalnego i prawidłowe wnioskowanie.

Następnie opisano procedury izolacji DNA (5.2.2.), a potem genotypowanie zaprezentowane w publikacji 1,2,4 przeprowadzone w oparciu o technologię DArTSeq które wykonała firma Diversity Arrays Technology Pty Ltd. z Australii, ale doktorant przedstawia skrócony opis metodyczny tego etapu w cyklu, a dokładną metodykę przywołuje publikacja 1 i 2. Kolejne moduły metodologiczne to: „Analizy statystyczne i mapowanie asocjacyjne” następnie „Mapowanie fizyczne”, „Analiza funkcjonalna sekwencji genów”, „Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych markerów SilicoDArT i SNP, sprzężonych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem siewek oraz cechami struktury plonu i plonem kukurydzy”, czy „Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami” i „Elektroforeza”. Rozbudowana część metodyczna świadczy o szerokim warsztacie metodologicznym Doktoranta ale również jest dowodem iż kolejne etapy badań wynikały w logiczny sposób z pytań które pozostawiały poprzednie wyniki badań.

Kolejny rozdział „Wyniki” obejmuje 15 stron, przedstawia w sposób uporządkowany i jasny wykazując zrealizowanie założonego celu. Kandydat podzielił opis uzyskanych wyników zgodnie z zakresem merytorycznym eksperymentów poszczególnych publikacji.

Wyniki przedstawione w podrozdziale 6.1. „Doświadczenie polowe i analizy fenotypowe” zawierają wyniki analiz pomiarów biometrycznych 392 genotypów łącznie takich cech jak zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor siewek kukurydzy (**Publikacji 1**) oraz plon i jego komponenty: długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów, liczba ziaren w rzędzie, masa ziaren z kolby, masa 1000 ziaren (Publikacja 2 i 4). W podrozdziale 6.2. „Genotypowanie i mapowanie asocjacyjne” Doktorant skonfrontował wyniki badań fenotypowych z wynikami sekwencjonowania NSG (otrzymano łącznie 81602 markery molekularne SilicoDArT i SNP). Po kolejnych rundach selekcji markerów gdzie kryterium była istotność markera dla obu cech jednocześnie (zdolność kiełkowania ziarniaków i wigor siewek kukurydzy) oraz najwyższa istotność statystyczna Doktorant wraz z Zespołem wybrał 20 najbardziej istotnych markerów, które następnie zostały wykorzystane do mapowania fizycznego aby określić ich położenie na mapie genetycznej. W przypadku analizy elementów plonu i jego struktury (Publikacja 2) wykorzystano te same wyniki sekwencjonowania NSG a liczbę markerów molekularnych zawężono do 16, gdzie kryterium była istotność dla czterech analizowanych cech jednocześnie w dwu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice). W wyniku kolejnej tury sekwencjonowania NSG (Publikacja 4) Kandydat wraz z zespołem uzyskał 92614 markerów molekularnych (SilicoDArT i SNP) a następnie po zastosowaniu kilkuetapowej selekcji ograniczono ich ilość do 20 markerów, biorąc pod uwagę tylko takie które były sprzężone z tymi samymi cechami w obu lokalizacjach (Kobierzyce i Smolice).

Następny etap badań Doktoranta to mapowanie fizyczne zaprezentowane w rozdziale 6.3. W rozdziale tym opisano konsekwentnie analizy sekwencji wybranych markerów molekularnych, bazując na dostępnych bazach danych wytypowano sześć markerów które znajdują się wewnątrz genów, z dużym prawdopodobieństwem, że te geny kandydujące mogą mieć wpływ na zdolność kiełkowania i wigor siewek kukurydzy (publikacja 1). W grupie 16 markerów istotnie związanych z cechami struktury plonu (długość kolby, średnica kolby, długość rdzenia, średnica rdzenia, liczba rzędów, liczba ziaren w rzędzie, masa ziaren z kolby, masa 1000 ziaren, plon) 6 znajdowało się wewnątrz genów a dla 10 ustalono lokalizacje i przedstawiono położenie względem najbliższych genów (publikacja 2). Kandydat wraz z Zespołem wybrał następnie 20 markerów statystycznie istotnych w obu punktach badawczych, ustalił dla 19 położenie oraz ustalił że 6 markerów SNP znajduje się wewnątrz scharakteryzowanych genów (publikacja 4). Kolejnym krokiem było zaprojektowanie starterów dla identyfikacji markerów związanych z analizowanymi cechami (publikacje 1,2, 4).

W rozdziale 7. Podsumowanie możemy znaleźć w zasadzie skondensowaną wersję dyskusji co przy pracy przygotowanej w oparciu o cykl publikacji nie było konieczne, liczy on 8,5 strony. Jest to na pewno na plus dla pracy, pomimo tego iż w Rozdziale 11 rozprawy (od str. 83 do 147) możemy znaleźć szczegółowe dyskusje związane z wynikami sekwencjonowania NSG i mapowania (asocjacyjne i fizyczne). Pan mgr inż. Bartosz Nowak podsumował wyniki badań w formie 10 wniosków, które można pogrupować w następujące obszary: 1. Wytypowanie w sumie 56 markerów (SilicoDArT i SNP) istotnie związanych ze zdolnością kiełkowania, wczesnym wigorem kukurydzy oraz plonem i jego elementami (wniosek 2,4,6). 2. Ustalenie markerów znajdujących się wewnątrz genów i wyjaśnienie związku tych genów z kiełkowaniem ziarniaków, wigorem siewek np. marker SilicoDArT (2,435,278) zlokalizowany na chromosomie 1 – wewnątrz genu syntazy sacharozy; marker związany z plonem kukurydzy np. SilicoDArT (11,657) znajdujący się na chromosomie 5,

wewnątrz genu aminotransferazy asparaginianowej; czy też marker SNP (28629) związany z cechami struktury plonu znajdujący się na chromosomie 8 wewnątrz genu receptoropodobnej kinazy białkowej (RLK) (wnioski 3,5,7). 3. Identyfikacja markerów o potencjalnym znaczeniu praktycznym np.: w selekcji genotypów cechujących się dobrymi wschodami i wysokimi plonami, podział genotypów na grupy heterotyczne i typowanie linii rodzicielskich do krzyżowań heterozyjnych, wytypowanie markerów SNP (28629, 29294) dobrze różnicujących genotypy pod kątem plonowania i tym samym o potencjalnym znaczeniu aplikacyjnym w hodowli kukurydzy na wysoki plon.

Wnioski są sformułowane rzetelnie, w pełni uzasadnione i adekwatne do uzyskanych wyników. Drobną uwagę może dotyczyć wniosków 3,5,7 są one zbyt szczegółowe i powtarzają informacje z rozdziału „Podsumowanie” gdzie mamy już podane lokalizacje markerów wewnątrz genów ponadto podano funkcje tych genów. Natomiast jako całość recenzowana rozprawa posiada wszystkie elementy określone w Ustawie i została napisana w przejrzysty i prawidłowy pod kątem układu rozdziałów sposób. Mam jednak pewne uwagi i sugestie dotyczące rozdziału Podsumowanie. Uwagi te będą zarazem moimi pytaniami do ewentualnego przedyskutowania i ustosunkowania się przez Kandydata. Biorąc pod uwagę potencjał aplikacyjny przedstawionych w pracy metod molekularnych w jakim stopniu metody te mogą usprawnić prace hodowcy w następujących obszarach:

1. Typowanie form rodzicielskich do hodowli heterozyjnej.
2. Czy uzyskane wyniki mogłyby zastąpić ocenę ogólnej i swoistej wartości kombinacyjnej? Jak wiadomo ocena ogólnej wartości kombinacyjnej (OWK, GCA), ma na celu wyłonienie linii dobrych a następnie ocena swoistej wartości kombinacyjnej (SWK, SCA) wyłonienie linii najlepszych. To jednak wymaga dużych nakładów finansowych związanych z krzyżowaniem w układach diallelicznych. W związku z tym czy według Doktoranta przedstawione metody molekularne mogą pomóc w tym obszarze?
3. Formy rodzicielskie mogą być selekcionowane w oparciu o dystans genetyczny pomiędzy nimi, określany przez polimorfizm markerów DNA. Proszę o podanie przykładów zależności między dystansem genetycznym a efektem heterozji.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej to „Spis literatury” (rozdział 9.) zawierający 119 pozycji z czego 99% to literatura anglojęzyczna, ściśle związana z przedmiotem rozprawy. Następny rozdział 10 „Oświadczenia doktoranta oraz współautorów dotyczące ich wkładu w przygotowanie opublikowanych artykułów naukowych” zawiera oświadczenie Pana mgr inż. Bartosza Nowaka o samodzielnym napisaniu rozprawy i oświadczenia współautorów dotyczące ich udziału w powstaniu publikacji. Tu mała krytyczna uwaga, gdyż w tym rozdziale byłoby wskazane zamieszczenie sumarycznej informacji na temat udziału Doktoranta w powstaniu prac. Oczywiście informacje takie możemy znaleźć w dołączonych publikacjach (str. 83-147). W publikacji I Kandydat jest pierwszym autorem pracy a jego udział polegał na współudziale w przygotowaniu koncepcji badań, następnie w szerokim ujęciu wykonaniu technicznym (metodyka, oprogramowanie, część graficzna) i kontroli merytorycznej. W publikacji II udział ten polegał na szeroko ujętej analizie danych eksperymentalnych i kluczowym dla ustalenia związku markerów z ważnymi cechami użytkowymi fenotypowaniu oraz przygotowaniu manuskryptu i pracach korekcyjnych. W publikacji 3. Kandydat był jedynym autorem, jest to praca przeglądowa podsumowująca możliwości wykorzystania metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy. W publikacji IV Pan mgr inż. Bartosz Nowak jest pierwszym autorem a jego udział polegał na opracowaniu zestawu danych eksperymentalnych do analiz i walidacji danych oraz uzyskanych wyników. To istotne informacje z formalnego punktu widzenia, na podstawie których wnioskuję o wiodącym udziale Doktoranta w powstaniu publikacji wykorzystanych do przygotowania rozprawy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Praca doktorska Pana mgr inż. Bartosza Nowaka została wykonana poprawnie pod względem metodycznym, a wartość jej wyników oceniam bardzo wysoko. Uzyskane wyniki wnoszą nowe oryginalne wartości poznawcze w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo. Autor posiada umiejętności wykorzystania zaawansowanych metod molekularnych i właściwego ich zastosowania na różnych populacjach kukurydzy - rośliny o bardzo dużym znaczeniu ekonomicznym. Kandydat wykazał się również umiejętnościami właściwej interpretacji uzyskanych wyników. Prezentowane wyniki badań spełniają również ważny formalny wymóg spójności tematycznej, gdyż oscylują wokół analiz molekularnych i próbie wyjaśnienia mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej w połączeniu z wieloaspektową oceną cech fenotypowych. Poziom edytorski rozprawy jak również jej styl, poprawność, przejrzystość i jednoznaczność oceniam pozytywnie.

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. Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową prezentowanej rozprawy oraz potencjalne znaczenie aplikacyjne prezentowanych markerów molekularnych wnioskuję o wyróżnienie dysertacji. W uzasadnieniu chciałbym dodać również rozbudowany moduł badań fenotypowych z dużą ilością przebadanego materiału roślinnego (linie, mieszańce) testowane w różnych lokalizacjach, oraz zastosowanie zaawansowanych technik molekularnych w celu wyjaśnienia mechanizmów wpływających na plonowanie kukurydzy. To trafne połączenie klasycznych metod fenotypowych z metodami molekularnymi stwarza możliwość wykorzystania wyników badań Doktoranta w praktycznej hodowli kukurydzy.

Tomasz Worecki