

Prof. dr hab. Adela Adamus
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. **Doroty Blatsios pt.**

” Zróżnicowanie kolekcji różaneczników (*Rhododendron* L.) pod względem cech dekoracyjnych, użytkowych, polimorfizmu DNA oraz efektywności mikrorozmnażania”

wykonanej w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

pod kierunkiem Pani dr hab. inż. Renaty Galek, prof. UPWr

Ocena problematyki badawczej

Krzewy ozdobne należące do rodzaju *Rhododendron* już na stałe zagościły w naszych parkach i ogrodach. Różnorodność morfologiczna i walory dekoracyjne różaneczników są powodem dużej popularności tej grupy roślin ozdobnych. Możliwość wegetatywnego mnożenia odmian z sadzonek a obecnie masowego namnażania z użyciem technik *in vitro* przyczyniła się do obecności tych krzewów we wszystkich szkółkach i centrach ogrodnictwa. Z kolei ciekawa biologia kwitnienia, możliwość krzyżowania pomiędzy gatunkami i tworzenia ciekawych mieszańców oddalonych od lat interesuje biologów i hodowców. Narodowa Kolekcja Różaneczników zgromadzona w Arboretum w Wojślawicach należy do największych w Polsce i jest źródłem materiałów wyjściowych do badań oraz dla hodowli nowych odmian.

Zebrane w ogrodach botanicznych kolekcje różnych gatunków roślin są charakteryzowane i porządkowane poprzez opis cech morfologicznych w połączeniu z molekularną oceną zróżnicowania genetycznego. Taki sposób postępowania jest obecnie trendem w ochronie zasobów genowych. Do tej grupy badań można zaliczyć pracę doktorską mgr inż. Doroty Blatsios, której celem była analiza walorów ozdobnych i zróżnicowania genetycznego wybranych genotypów z kolekcji różaneczników rosnących w Arboretum Leśnym im. Prof. Stefana Białoboka w Sycowie.

Analiza formalna pracy

Przedstawiona do recenzji praca posiada konstrukcję typową dla rozpraw doktorskich z zakresu nauk przyrodniczych. Rozprawa doktorska liczy 104 strony oraz dołączone (bez numeracji stron) załączniki: nr 1 – tabele (46 szt.), nr 2 – wykresy (36 szt.), nr 3 – zdjęcia (21 szt.). Część opisowa pracy została podzielona na 7 rozdziałów: *Wstęp i cel pracy*, *Przegląd literatury*, *Material*, *Metody*, *Wyniki*, *Dyskusja* i *Wnioski*, w ramach których wydzielono podrozdziały. Spis literatury zawiera 165 pozycji, w większości anglojęzycznych, dobrze dobranych do omawianych zagadnień. Do pracy nie dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim.

Praca została napisana poprawnym językiem, ale z licznymi błędami literowymi. Dyskomfort w czytaniu wprowadza używanie pojęcia „ilość” zamiast liczba, w przypadku prawie wszystkich wartości policzalnych.

Merytoryczna ocena pracy

W rozdziale *Wstęp i cel pracy* Autorka przedstawiła krótkie wprowadzenie i wskazała cel pracy, który polegał na wyborze z istniejącej kolekcji różaneczników grupy krzewów, u których oceniono liczne cechy morfologiczne i walory dekoracyjne. Następnie za pomocą molekularnej

analizy ISSR sprawdzono polimorfizm DNA w badanej grupie. Dla wybranych genotypów wykonano optymalizację metod rozmnażania wegetatywnego i mikrorozmnażania. Przeprowadzono także ankietę wśród ogrodników-amatorów na temat preferencji przy wyborze odmiany do nasadzeń ogrodowych.

Rozdział *Przegląd literatury* zawiera informacje o systematyce rodzaju *Rhododendron*, opisuje zasięg występowania i charakterystykę morfologiczną części wegetatywnych i kwiatów różaneczników. Jest też krótka charakterystyka cytogenetyczna rodzaju oraz podrozdziały o metodach i kierunkach hodowli różaneczników, których ciąg myślowy rozbija podrozdział 2.7 pt. *Zastosowanie*, w którym mowa o zaletach różaneczników, ich walorach dekoracyjnych i możliwości zastosowania w nasadzeniach oraz w medycynie. Ponadto do metod hodowli tradycyjnej zaliczone zostało rozmnażanie rododendronów z sadzonek pędowych a do metod biotechnologicznych hodowli - mikrorozmnażanie. Rozmnażanie wegetatywne przez sadzonki oraz rozmnażanie *in vitro* nie są metodami hodowli a są technikami pozwalającymi na mnożenie materiału nasadzeniowego na skalę komercyjną i dlatego wydzielenie ich z rozdziału *Hodowla* byłoby słusniejsze. W kolejnym podrozdziale pt. *Markery molekularne* przedstawiono przegląd technik molekularnych, które są używane do oceny polimorfizmu DNA, identyfikacji gatunków, określenia dystansu genetycznego czy identyfikacji form mieszańcowych. Dla logiczniejszego układu *Przeglądu literatury* ostatni podrozdział (2.9) należałoby rozdzielić i wzbogacić tekstem poprzednie podrozdziały, traktujące o krzyżowaniach oddalonych czy zmianach mutacyjnych poszerzających zmienność morfologiczną badanego rodzaju.

W rozdziale *Materiał badawczy* nie znalazłam ważnych w przypadku każdej pracy naukowej informacji o pochodzeniu materiału roślinnego. Kolekcja narodowa różaneczników odmiany łużyckiej ma swój rodowód, znany w Arboretum w Wojsławicach a także zawarty w publikacji Grzeszczak-Nowak i Muras 2004 i wiadomo, że hodowca Rudolf Seidler krzyżował gatunki *R. catawbiense*, *R. caucasicum*, *R. metternichii* i *R. smirnowii*. W ten sposób otrzymał liczną grupę, z której ponad 100 mrozoodpornych mieszańców znajduje się w Kolekcji Narodowej. Po dokładnym przeanalizowaniu nieprecyzyjnie brzmiących informacji, ustaliłam, że formy mateczne rosły w Wojsławicach, zapylone zostały mieszaniną pyłku o nieznanym pochodzeniu, z krzewów matecznych zebrano nasiona, wysiano i rośliny wysadzono w Sycowie. Autorka nazywa je mieszańcami. Skąd pewność, że są to mieszańce, jeżeli na str.12 zawarta jest informacja, że kwiaty *Rhododendron cyt.* „są samopylne, jednak mogą być zapylane przez owady” a z dyskusji (str.85) dowiadujemy się, że „rozmnażanie płciowe, wykorzystujące wiatr sprzyja wymianie genów między osobnikami”. Proszę więc o informacje dotyczące biologii kwitnienia i zawiązywania nasion u różaneczników.

Proszę też o wyjaśnienie w jaki sposób wybrano nasiona do wysiewu? Czy była to próba losowa z całej kolekcji w Wojsławicach, czy pobrano je z grupy roślin rosnących obok siebie? Jakie obiekty były matkami a z jakich odmian czy gatunków mógł pochodzić pyłek ojcowski?

Rozdział *Metody* podzielony na podrozdziały zawiera informacje o sposobie i terminach wykonania pomiarów cech morfologicznych oraz analizy statystyczne, w tym obliczenia zaawansowane, użyte w celu zobrazowania zmienności tych cech i zależności pomiędzy nimi. Do analiz statystycznych brano wyniki z 3 lat pomiarów cech morfologicznych. Różaneczniki są wrażliwe na warunki klimatyczne, więc czy rozkład temperatur i opadów był w tych latach na tyle podobny, że można było tak postąpić? Kolejne podrozdziały opisują doświadczenia nad rozmnażaniem technikami ukorzenia sadzonek oraz kultur *in vitro*. Eksplantatem wyjściowym do mikrorozmnażania były pąki kwiatowe, które wykładano na 3 pożywki o zróżnicowanym składzie. Z otrzymanych pędów pobierano dwa rodzaje eksplantatów i wykładano na 7 różnych

pożywek w celu ustalenia czynników wpływających na jakość regenerantów otrzymanych w procesie mikrorozmnażania a nie na efektywność (jak podaje Doktorantka), bo ta oznacza liczbę regenerantów z 1 eksplantatu, natomiast w pracy oceniano: wysokość, liczbę liści, długość pędów kątowych itd. Moje pytania do tego rozdziału: dlaczego eksplantaty pierwotne wykładano na 3 różne pożywki (których działania nie monitorowano) oraz po ile eksplantatów wyłożono w każdej z kombinacji właściwego doświadczenia *in vitro*?

W kolejnych podrozdziałach wskazano metodykę oceny polimorfizmu DNA przy użyciu markerów ISSR i metody statystyczne użyte do wykonania dendrogramu pokazującego dystans genetyczny pomiędzy badanymi genotypami. Rozdział *Metody* kończy opis przeprowadzenia ankiet na temat preferencji wyboru odmian różaneczników do nasadzeń.

Podsumowując stwierdzam, że oprócz pytań, które zadałam powyżej, rozdział *Metody* zawiera prawidłowy opis doświadczeń polowych, laboratoryjnych i molekularnych. Metody statystyczne zostały prawidłowo zaplanowane.

Rozdział *Wyniki* składa się z 5 podrozdziałów. 5.1 dotyczy charakterystyki obiektów po względem 36 cech morfologicznych, przez 3 lata, zgodnie z instrukcją OWT. Na podkreślenie zasługuje ogrom pracy włożonej w wykonanie tych pomiarów. Także charakterystyka statystyczna każdej z cech, poprzez zastosowanie analizy wariancji, wyliczenia współczynnika zmienności, wyznaczenie macierzy współczynników korelacji, analizy skupień oraz analizy składowych głównych jest obszerna i świadczy o tym, że Doktorantka zna zaawansowane metody matematyczne analizy doświadczeń. Mam jednak zastrzeżenia dotyczące zgodności danych przedstawionych w tabelach i na wykresach oraz interpretacji niektórych wyliczeń statystycznych. Analizę cech morfologicznych wykonano na 75 krzewach różaneczników wybranych z kolekcji i taką liczbę roślin uwzględniono przy obliczeniach statystycznych. Natomiast wykresy frekwencji obiektów w klasach bonitacyjnych wskazanych przez OWT pokazują, że ocenianych było 73, 74, 76, 82 a nawet 105, zamiast 75 roślin (wykr.1-21). Istnieje więc brak zgodności pomiędzy wykresami a danymi w tab. 14. Ponadto w podrozdziale tym zwraca uwagę brak logicznego ciągu omawianych cech. Ocena rozpoczyna się od pokroju krzewów, następnie kolejno cech liścia, cech kwiatu, zabarwienia kwiatu i w kolejnym podrozdziale powrót do oceny wielkości krzewów, liści i kwiatów.

W tab. 1 jest informacja, że oceniano liczbę płatków korony, a w omawianych wynikach nie znalazłam tej cechy. Z kolei w tab.14 wykazano obliczenia statystyczne dla cechy *Długość: kwiat z szypułką* a cecha ta nie jest wykazana w metodyce OWT (tab.4).

Podrozdział 5.2. *Analiza rozmnażania wegetatywnego różaneczników in vitro*, którą wykonano dla 37 (lub 36 bo nr 18 występuje 2x) obiektach wykazała bardzo niski procent pędów ukorzenionych (27%) i jeszcze niższy przyjętych sadzonek (17%). Jaka jest tego przyczyna w przeprowadzonym doświadczeniu, bo przecież metoda ta jest używana do komercyjnego mnożenia rododendronów.

Podrozdział 5.3 *Analiza procesu mikrorozmnażania* wykonana dla dwóch obiektów nr 96 i 59 (w metodyce był jeszcze wskazany nr 47?) pozwoliła ustalić jak na cechy morfologiczne regenerantów wpłynęły: czynnik genetyczny, rodzaj eksplantatu, skład pożywki i pomiędzy którymi czynnikami wystąpiły interakcje. Regeneranty otrzymane z 2 genotypów oceniono pod względem 4 cech, z których każdą poddano analizie statystycznej. Wykonano analizy wariancji jednoczynnikowe, dwuczynnikowe dla każdego obiektu oddzielnie, dla 2 genotypów i pożywki, wyciągano szczegółowe wnioski a na końcu przedstawiono analizę wariancji trzy czynnikową (genotyp, eksplantat, pożywka). Po co tyle wcześniejszych obliczeń, przecież po to są wieloczynnikowe analizy wariancji, aby posłużyły do oceny wpływu wszystkich czynników oddzielnie i interakcji pomiędzy nimi. Dlaczego więc tak skomplikowano analizę statystyczną podrozdziału *Analiza*

procesu mikrorozmnażania? Ponadto podczas przygotowywania pracy do publikowania wyników proszę dokładnie sprawdzić tabele analizy wariancji i ich zgodność z wnioskowaniem szczegółowym, gdyż zawierają one zaznaczone czynniki jako istotne, a test Tukey'a wykazuje brak istotności i odwrotnie (np. tab. 9 i 14, 24 i 25, 26 i 27, 28 i 29, 29 i 30). Proszę pamiętać, że jeżeli kilka czy kilkanaście wartości liczbowych zostało zaliczonych do grupy jednorodnej nie należy wybierać najniższą i najwyższą wartość i uważać je za najlepszą i najgorszą, bo różnic statystycznych pomiędzy wartościami całej grupy nie ma, więc wszystkie dane są równoważne.

W podrozdziale 5.4 *Analiza zróżnicowania genetycznego z wykorzystaniem markerów ISSR* wykazano polimorfizm na poziomie DNA, co jest u roślin obcocyplnych spodziewanym wynikiem. Większość, bo 88% obiektów zakwalifikowano do dwóch klastrów, co wskazuje na małe zróżnicowanie genetyczne badanej kolekcji. Jeżeli obiektami były mieszańce, to analizy molekularne powinny posłużyć do potwierdzenia tej tezy. Jednak w przypadku, kiedy nie są znani rodzice to do badań należało włączyć podstawowe gatunki, z których powstała kolekcja. Gdyby sprawdzono dystans genetyczny pomiędzy nimi i badanymi obiektami, uzyskalibyśmy informację o skali zmienności i poznalibyśmy jaką pulę genetyczną prezentuje badana populacja w stosunku do gatunków wyjściowych.

Podrozdział 5.5. *Analiza badania opinii publicznej* opisuje jak ankietowani odpowiadali na pytania dotyczące preferencji cech morfologicznych różaneczników, które wybraliby do swojego ogrodu. Jest to interesujący wycinek wskazujący na gusta kupujących rododendrony.

Rozdział *Dyskusja* składający się z 11 stron, podzielonych na podrozdziały, zawiera informacje, które obiekty z kolekcji można uznać za interesujące ze względu na ciekawe walory ozdobne. Następnie opisane są badania innych autorów nad stosowanymi stymulatorami ukorzeniania *in vivo*. Treści te zgadzają się z tytułami podrozdziałów, ale w podrozdziale 6.3 *Badania in vitro* znajdujemy definicję współczynnika korelacji, wyjaśnienia na czym polega analiza składowych głównych i analiza skupień, jak je wykorzystać, ale bez dyskusji z danymi, które otrzymano w pracy. Jest to więc fragment nadający się do przeglądu literatury i nie ma nic wspólnego z badaniami *in vitro*. Dopiero dalej następuje fragment dyskutujący z innymi pracami wyniki nad mikrorozmnażaniem różaneczników. Podobnie podrozdział 6.4 *Analizy molekularne* zawiera opis niezastosowanych w tej pracy technik molekularnych, ich działanie i wykorzystanie. Taki fragment powinien być w przeglądzie literatury. Rozdział ten wymaga więc uporządkowania i zmian w celu nadania mu bardziej dyskusyjnego charakteru.

Rozdział *Wnioski* nie odzwierciedla w pełni otrzymanych wyników, np. brak informacji, że badaną kolekcję pogrupowano pod względem podobieństwa cech morfologicznych, wyliczono wzajemne zależności pomiędzy cechami, czy, że wybrano grupę obiektów o szczególnych walorach dekoracyjnych i do czego te obiekty można wykorzystać. Wniosku 7.1/2 nie rozumiem, a 7.3 zawiera sprzeczne informacje o uniwersalnej, niezależnej od genotypu pożywce do mikrorozmnażania oraz, że cyt. „różne genotypy wymagają innej koncentracji oraz rodzaju regulatorów wzrostu”.

Spis literatury obszerny, dobrze dobrany do problematyki badawczej, jednak nie jest ułożony alfabetycznie (w przypadku kilku liter). Znalazłam 6 pozycji literatury ujętych w spisie a nie cytowanych w tekście oraz 9 pozycji z tekstu, których nie ma w spisie literatury lub mają inny rok publikacji.

Zważywszy na unikalność Wojsławickiej Kolekcji Rododendronów, za najważniejsze osiągnięcia ocenianej pracy uważam:

- wnikliwy opis cech morfologicznych obiektów znajdujących się w kolekcji i szczegółową analizę statystyczną, która pozwoliła pogrupować badane genotypy oraz wskazać zależności pomiędzy analizowanymi cechami różaneczników,
- wyselekcjonowanie (patrz *Dyskusja*) 12 obiektów, których cechy morfologiczne są interesujące pod względem walorów ozdobnych, wskazanie wśród nich na formy o niespotykanych dotąd cechach, których przyporządkowanie do głównych typów istniejących odmian (za pomocą The International Rhododendron Register and Checklist) było niemożliwe. Obiekty te mogą zostać nowymi odmianami lub służyć jako materiał wyjściowy do hodowli krzyżówkowej,
- wykorzystanie analizy molekularnej do wskazania pojedynczych obiektów, które ocena dystansu genetycznego zaliczyła do grupy wykazującej odrębność genetyczną od pozostałej części populacji. Genotypy takie mogą służyć do poszerzenia zmienności genetycznej materiału hodowlanego,
- opracowanie metodyki mikrorozmnazania poprzez ustalenie rodzaju eksplantatu i składu pożywki, która użyta w kulturach *in vitro* różaneczników z Narodowej Kolekcji pozwoli uzyskać sadzonki dobrej jakości.

Zwracam jednak uwagę, że większość wyników Autorka przed publikacją musi zweryfikować pod względem poprawności interpretacji. W maszynopisie zaznaczyłam błędy i wątpliwości.

Wyniki przedstawione przez Autorkę w recenzowanej pracy mogą służyć jako podstawa do oceny innych kolekcji różaneczników. Aspekt badawczy mają przeprowadzone analizy molekularne oraz doświadczenia nad rozmnażaniem *in vitro*. Wybór odpowiedniej pożywki i eksplantatu do mikrorozmnazania wskazuje na aspekt praktyczny uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że **rozprawa doktorska Pani mgr inż. Doroty Blatsios pt. "Zróżnicowanie kolekcji różaneczników (*Rhododendron* L.) pod względem cech dekoracyjnych, użytkowych, polimorfizmu DNA oraz efektywności mikrorozmnazania"** jest wartościowa pod względem poznawczym i aplikacyjnym. Wykonane badania będą podstawą do oceny innych kolekcji różaneczników, przyczynią się do opracowania efektywnej metodyki mikrorozmnazania tego gatunku a wyselekcjonowane obiekty mogą być użyte w hodowli nowych odmian różaneczników. Praca zawiera udokumentowane wyniki. Użyte przez Doktorantkę metody statystyczne, techniki kultur *in vitro* i analiz molekularnych świadczą o tym, że je zna a także potrafi wykorzystać w badaniach naukowych.

Reasumując, stwierdzam, że oceniana praca **spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim** przez Ustawę z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, określone w artykule 13 Ustawy. (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Doroty Blatsios do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków 27.02.2020


/Adela Adamus/