

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Suchowilska

Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Inżynierii Biosurowców

Wydział Rolnictwa i Leśnictwa

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Bartosza Nowaka
pt. „Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem
kukurydzy zwyczajnej *Zea mays*”.**

1. Wprowadzenie

Niniejsza ocena została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu Pana prof. dr hab. Andrzeja Blecharczyka z dnia 15.04.2024 roku- RNDRIO-15/4000/2024. Przedłożona rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu pod kierunkiem Pani dr hab. Agnieszki Tomkowiak prof. UPP.

2. Podstawowe informacje o Doktorancie

Pan Bartosz Nowak jest absolwentem Zespołu Szkół Rolniczych w Grabonogu, gdzie uzyskał stopień technika rolnika z wynikiem bardzo dobrym. W roku 2017 ukończył studia I stopnia z zakresu nauk rolniczych na Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu. Dalszą naukę kontynuował na studiach niestacjonarnych magisterskich w tej samej jednostce naukowej na kierunku Rolnictwo o specjalności Agronomia. W 2019 roku z wynikiem bardzo dobrym uzyskał tytuł zawodowy magistra inżyniera. W latach 2015-2016 był zatrudniony w Biurze Doradztwa Rolniczego w Kobylinie. W latach 2016-2020 pracował w firmie Limagrain Central Europe na stanowisku technika doświadczalnego. Od sierpnia 2020 roku pracuje w firmie Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o Grupa IHAR na stanowisku hodowcy.

Kandydat nie ubiegał się uprzednio o nadanie stopnia doktora.

3. Tytuł, forma i problematyka badawcza rozprawy doktorskiej stanowiącej podstawę ubiegania się o nadanie stopnia doktora

Rozprawa doktorska mgr. inż. Bartosza Nowaka pt. „Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej *Zea mays*” stanowi zbiór czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w języku angielskim i polskim w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i krajowym. Dwie publikacje ukazały się w roku 2022, jedna w roku 2023 i jedna w roku 2024.

Doktorant jest pierwszym autorem w trzech pracach, spośród czterech prac ocenianego cyklu. Udział Doktoranta w powstaniu prac nie budzi zastrzeżeń.

W mojej opinii, wymienione przez Kandydata aktywności związane z powstaniem prac składających się na rozprawę doktorską oraz wkład autorski pozwalają na weryfikację ogólnej wiedzy teoretycznej z zakresu dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Tematyka badawcza podjęta w rozprawie doktorskiej Pana mgr. inż. Bartosza Nowaka jest istotna i ważna z rolniczego punktu widzenia, gdyż kukurydza (*Zea mays* L.), tuż po pszenicy zwyczajnej, jest drugą najważniejszą gospodarczo rośliną świata. W ciągu ostatniego ćwierćwiecza produkcja kukurydzy wzrosła ponad dwukrotnie, czemu sprzyja zarówno znaczny wzrost plonów jak i ekspansja na coraz szersze obszary. Wspomniana wyżej dynamika wzrostu plonów kukurydzy nie byłaby możliwa, gdyby nie udział postępu biologicznego, na który znaczący wpływ ma wprowadzenie nowej zmienności genetycznej. We współczesnym rolnictwie jednym z najważniejszych czynników decydujących o wynikach produkcji kukurydzy jest odmiana.

Wyliczenia różnych autorów wskazują, że uzyskany w ostatnim półwieczu bezprecedensowy wzrost plonów roślin uprawnych to przynajmniej w 50% zasługa postępu biologicznego, tj. nowych odmian i metod hodowlanych. Kukurydza jest rośliną, w której uprawie nowe odmiany odgrywają szczególnie istotną rolę. Przełomowym zdarzeniem w historii uprawy kukurydzy było wprowadzenie mieszańców heterozyjnych. Dzięki temu plony kukurydzy w USA i Europie wzrosły blisko 4-krotnie. W USA postęp w hodowli i wprowadzanie do uprawy kolejnych generacji odmian mieszańcowych skutkowało wzrostem plonów z początkowych 15-20 dt/ha do średnio ponad 100 dt/ha. Podobnie jak w innych przodujących rolniczo krajach, również w Polsce systematyczny wzrost plonów kukurydzy, jaki obserwujemy od ponad 50 lat, to przede wszystkim zasługa nowych kreacji odmianowych. Odmiany mieszańcowe kukurydzy plonują wysoko dzięki heterozji, czyli tzw. bujności. Współcześnie odmiany mieszańcowe kukurydzy reprezentowane są przez dwa typy hodowlane:

- mieszańce trójliniowe (TC), tworzone z krzyżówek trzech linii (A x B) x C),
- mieszańce pojedyncze (SC; dwuliniowe), tworzone z dwóch linii (A x B).

Największy efekt heterozji wykazują mieszańce pojedyncze, będąc przy tym najbardziej wyrównane morfologicznie. Ich mankamentem jest trudniejsza produkcja nasienna, co przekłada się na wyższą cenę materiału siewnego. Mieszańce trójliniowe mają nieco mniejszy potencjał plonowania, ale zachowują dobrą zdolność przystosowawczą do zmiennych warunków pogodowo-glebowych. Efekt heterozji dotyczy w zasadzie tylko pierwszego pokolenia mieszańca, później szybko wygasa, co przejawia się niewyrównaniem

roślin na plantacji i różnicami we wzroście, rozwoju oraz plonowaniu. Tymczasem w praktyce rosnące koszty produkcji kukurydzy powodują, że część rolników szuka oszczędności, wysiewając ziarno II generacji (czyli pokolenie F₂), a więc materiał siewny otrzymany z rozmnożenia ziarna kwalifikowanego zakupionego rok wcześniej. Wprawdzie można dzięki temu zaoszczędzić kilkaset zł na ha, ale jest to działanie nieracjonalne, ponieważ straty w wielkości plonu i jego jakości są zwykle większe niż uzyskane oszczędności.

Potencjał plonowania odmian będących w dyspozycji polskiego rolnictwa wzrósł w minionych 40 latach o 60 dt/ha (1,5 dt/ha rocznie), czyli mniej więcej dwukrotnie. Aktualnie (stan na maj 2024) w Krajowym Rejestrze Odmian (KR) COBORU wpisane są 282 odmiany kukurydzy. Największą grupę stanowią odmiany kukurydzy ziarnowej. W Polsce i krajach unijnych ziarno kukurydzy znajduje zastosowanie przede wszystkim jako pasza dla zwierząt.

W świetle powyższych faktów podjęta przez mgr. inż. Bartosza Nowaka tematyka badawcza jest ważna i uzasadniona, szczególnie, że ma przełożenie do praktyki rolniczej. Niewątpliwie wpłynie na skrócenie prac hodowlanych nad nowymi odmianami kukurydzy.

W mojej opinii temat pracy został trafnie sformułowany, dobór technik badawczych jest odpowiedni a wybór rośliny uzasadniony z naukowego i rolniczego punktu widzenia.

Zakres wykonanych prac oceniam wysoko, nadmieniając, że są to trudne zagadnienia, które wymagały opanowania warsztatu badawczego, z którym Doktorant sobie znakomicie poradził.

4. Formalna analiza rozprawy

Prezentowana dysertacja składa się, jak już wspomiano wcześniej, z czterech powiązanych tematycznie (trzech anglojęzycznych i jednej polskojęzycznej pracy przeglądowej) opublikowanych w latach 2022-2024. Łączna liczba punktów MNiSW dla artykułów wchodzących w skład zbioru wynosi 380, zaś współczynnik IF jest równy 12,6.

Trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej są opracowaniami współautorskimi, jedna publikacja przeglądowa w czasopiśmie *Fragmenta Agronomica* jest jednoautorska. Tym samym Doktorant spełnia jeden z warunków stawianym Kandydatom na stopień doktora, czyli opanowanie umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Rozprawa obejmuje 61 stron maszynopisu. Dołączone zostały do niej cztery oryginalne publikacje wraz z oświadczeniami współautorów. Całość podzielona została na 11 rozdziałów głównych:

1. Streszczenie i słowa kluczowe;
2. Summary and keywords;
3. Wstęp;
4. Hipotezy badawcze, cel główny i cele szczegółowe rozprawy doktorskiej;
5. Materiał roślinny i metodyka badań;
6. Wyniki;
7. Podsumowanie;
8. Wnioski;
9. Spis literatury (liczący 119 pozycji literatury);
10. Oświadczenia doktoranta oraz współautorów prac;

11. Artykuły wchodzące w skład zbioru:

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= 5,6

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 (iss. 5), art. 848. <https://doi.org/10.3390/genes13050848>.

Punktacja wg MNiSW (2021): 100; IF: 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=3,5

Powyższe publikacje są niewątpliwie spójne tematycznie i stanowią efekt przemyślanego i logicznego procesu badawczego. Bazę bibliograficzną w przypadku pierwszej pracy stanowi 46 pozycji literatury, w drugiej 49 pozycji, w trzeciej 46 pozycji i czwartej 74 pozycje. Zdecydowana większość cytowanej literatury jest angielskojęzyczna i pochodzi z czasopism o międzynarodowym zasięgu. Dobór literatury jest ściśle związany z tematyką prac stanowiąc dobre kompendium wiedzy. Praca przeglądowa w czasopiśmie *Fragmenta Agronomica* przedstawia wykorzystanie metod biotechnologicznych w hodowli kukurydzy i jest dobrym tłem dla prowadzonych badań.

Z formalnego punktu widzenia rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

5. Merytoryczna analiza rozprawy

Podjęta tematyka badawcza jest ważna z naukowego i praktycznego punktu widzenia. Znajduje się w obszarze trudnych badań genetyczno-biotechnologicznych o dużych wartościach poznawczych i aplikacyjnych. Postęp biologiczny jest szczególnie ważny u kukurydzy, gdyż ma on wpływ na dopasowanie uprawianych odmian do zmieniających się warunków klimatycznych.

Za cel badań Autor postawił sobie identyfikację nowych markerów molekularnych sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków oraz wczesny wigor kukurydzy, dzięki wykorzystaniu sekwencjonowania nowej generacji, mapowania asocjacyjnego i fizycznego.

Ponadto wyznaczył sześć celów szczegółowych, które dotyczyły:

1. Określenia stopnia spokrewnienia pomiędzy analizowanymi genotypami dzięki wykorzystaniu markerów molekularnych SilicoDArT i SNP otrzymanych w wyniku sekwencjonowania nowej generacji (NGS).
2. Identyfikacji markerów molekularnych SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami warunkującymi plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
3. Mapowania fizycznego polegającego na przedstawieniu rzeczywistej pozycji zidentyfikowanych markerów i sprzężonych z nimi genów.
4. Charakterystyki wytypowanych genów kandydujących warunkujących plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
5. Projektowania starterów służących do identyfikacji wyselekcjonowanych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi warunkujących plon ziarna, zdolność kiełkowania ziarniaków i wczesny wigor kukurydzy.
6. Wykorzystania łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do testowania wybranych markerów molekularnych na roślinnych materiałach referencyjnych.

Dodatkowo Doktorant wyznaczył cztery hipotezy badawcze, które brzmiały następująco:

1. wykorzystanie technik sekwencjonowania nowej generacji (NGS) połączonych z mapowaniem asocjacyjnym i fizycznym umożliwi identyfikowanie skutecznych markerów molekularnych lub regionów QTL sprzężonych z plonem, cechami struktury plonu, zdolnością kiełkowania ziarniaków i wigorem kukurydzy *Zea mays*;
2. wytypowanie, a następnie wykorzystanie nowych, specyficznych markerów molekularnych pozwoli na wstępną selekcję komponentów rodzicielskich do krzyżowań i dalszych prac hodowlanych;

3. wykorzystanie zidentyfikowanych markerów molekularnych SilicoDArT i SNP pozwoli ustalić stopień podobieństwa genetycznego między liniami wsobnymi w przypadku, kiedy nie posiadamy informacji o rodowodzie lub informacje te są niepełne, co ograniczy lub wyeliminuje kosztowne i pracochłonne krzyżowanie w układach diallelicznych;
4. wykorzystanie najnowszych technik biologii molekularnej pozwoli na ograniczenie czasu i kosztów wyhodowania nowych odmian kukurydzy.

Realizacja założonych celów rozprawy oraz hipotez wymagała przeanalizowania materiału roślinnego za pomocą zróżnicowanych metod badawczych, obejmujących zarówno obserwacje polowe, analizy laboratoryjne, statystyczne oraz bioinformatyczne. Dobór i zakres metod badawczych należy uznać za wystarczający i umożliwiający realizację założonych celów badania.

Materiałem roślinnym użytym do badań przedstawionych w publikacjach 1, 2 i 4 były łącznie 392 genotypy kukurydzy *Zea mays* L. (250 linii wsobnych, 122 mieszańce F₁ oraz 20 genotypów referencyjnych wysoko- i niskoplonujących). Materiał pochodził z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o. Linie o ziarnie typu flint pochodziły między innymi z Francji (populacja Lacaune), z Hiszpanii (populacja wywodząca się z Pirenejów) i Niemiec (German Flint). Linie o ziarnie typu dent pochodziły z różnych grup ze Stanów Zjednoczonych.

W rozdziale „Metodyka badań wyróżniono następujące podrozdziały:

- ✓ Fenotypowanie
- ✓ Izolacja DNA
- ✓ Genotypowanie
- ✓ Analizy statystyczne i mapowanie asocjacyjne
- ✓ Mapowanie fizyczne
- ✓ Analiza funkcjonalna sekwencji genów
- ✓ Projektowanie starterów dla zidentyfikowanych markerów SilicoDArT i SNP, sprzężonych ze zdolnością kiełkowania ziarniaków, wigorem siewek oraz elementami struktury plonu i plonem kukurydzy
- ✓ Identyfikacja wybranych markerów SilicoDArT i SNP sprzężonych z genami kandydującymi, warunkującymi plon kukurydzy wraz z jego komponentami.
- ✓ Elektroforeza

W każdym z podrozdziałów Doktorant szczegółowo opisuje kolejne etapy badań, które wykonał podczas pracy.

Metodyka prac jest prawidłowa, ich układ przemyślany, wyniki badań są właściwie opisane i przedyskutowane na tle dostępnej literatury. W mojej opinii wartość składających się na rozprawę publikacji jest wysoka i nie budzą one zastrzeżeń. Prace napisane są językiem zrozumiałym i umożliwiającym sprawne śledzenie przeprowadzonych badań i analizę przedstawionych wyników. Pomimo dużej liczby zgromadzonych danych wyniki opracowano i

opisano syntetycznie. Wyniki prezentowanych prac jednoznacznie uprawniają do zweryfikowania postawionych hipotez badawczych. Układ pracy jest logiczny i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim.

Doktorant wykazał się dobrą znajomością literatury, którą umiejętnie wykorzystał w swojej dysertacji. Rozdział „Wyniki badań” został przedstawiony na 23 stronach dysertacji, na koniec Doktorant sformułował 10 poprawnych wniosków.

Pracę kończy rozdział „Spis literatury” liczący 119 pozycji. Cytowania są prawidłowe, większość prac jest angielskojęzyczna. Opis wyników zawartych w ocenianych publikacjach naukowych wskazuje na dobre rozeznanie Doktoranta w zakresie tematyki objętej badaniami.

Do najważniejszych wyników, które uzyskał Autor podczas realizacji pracy doktorskiej należy zaliczyć zidentyfikowanie 20 markerów molekularnych, które były związane ze zdolnością kiełkowania ziarniaków oraz wigorem siewek. Spośród nich 6 markerów znajdowało się wewnątrz genów. W 4 przypadkach zgodnie z doniesieniami literaturowymi geny te mogą mieć wpływ na kiełkowanie ziarniaków oraz wigor u kukurydzy. W kolejnym etapie badań zidentyfikowano łącznie 36 markerów molekularnych związanych z cechami struktury plonu oraz plonem. Spośród tych markerów 11 zlokalizowane było wewnątrz genów. W 5 przypadkach zgodnie z najnowszymi doniesieniami literaturowymi geny te są odpowiedzialne za wysokość plonu. Wszystkie zidentyfikowane, istotne statystycznie markery mogą zostać wykorzystane w procesie hodowli kukurydzy do selekcji komponentów rodzicielskich do krzyżowań. Pozwoli to na skrócenie cyklu hodowlanego i jednocześnie na oszczędność środków materialnych.

Dyskusja wyników, będąca wyznacznikiem dojrzałości naukowej Doktoranta, nie budzi moich zastrzeżeń.

Wielką zaletą recenzowanej rozprawy jest jej przejrzysta struktura. Praca jest starannie przygotowana, styl i poprawność językowa oraz poziom edytorski również nie budzą moich zastrzeżeń. Zauważyłam błąd w nazwie łacińskiej pszenicy zwyczajnej na stronie 11, jest „*Triticulum aestivum* L” a powinno być *Triticum aestivum* L., jest to zapewne autokorekta edytora tekstu Word. Nie wpływa to na poziom pracy.

Podsumowując należy stwierdzić, że Doktorant przygotowując ocenianą dysertację wykazał się odpowiednim poziomem ogólnej wiedzy teoretycznej z dyscypliny rolnictwo i ogrodnictwo. Legitymuje się również umiejętnością samodzielnej pracy naukowej. Nie ulega wątpliwości, że przygotowana przez mgr. inż. Bartosza Nowaka rozprawa stanowi oryginalne i cenne rozwiązanie postawionego problemu.

W moim przekonaniu przedstawiona do oceny dysertacja oparta na cyklu czterech monotematycznych publikacji pod wspólnym tytułem „Wielowymiarowa analiza molekularnych mechanizmów związanych z plonowaniem kukurydzy zwyczajnej *Zea mays*” jest pionierska i wnosi nowe wartości poznawcze i użyteczne oraz charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym.

6. Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę poziom naukowy rozprawy doktorskiej, jak również dojrzałość naukową Doktoranta, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. inż. Bartosza Nowaka spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z póź. zm.).

Zgodnie z obowiązującym stanem prawnym dotyczącym szczegółowego trybu przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich, składam formalny wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr. inż. Bartosza Nowaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Elżbieta Suchowilska', is written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark.

Prof. dr hab. inż. Elżbieta Suchowilska