

Sękocin Stary, 11 maja 2016 r.

Dr hab. Justyna Nowakowska, prof. IBL
Instytut Badawczy Leśnictwa
Laboratorium Biologii Molekularnej
Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3
05-090 Raszyn

Ocena pracy doktorskiej Pana **mgr inż. Pawła Przybylskiego**, wykonanej w Instytucie Badawczym Leśnictwa pod kierunkiem prof. dr hab. Ireneusza Odrzykoskiego, zatytułowanej „**Zmienność genetyczna wybranych plantacji nasiennych sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w aspekcie błędów przypisania szczepów do drzew matecznych**”.

Rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Przybylskiego dotyczy szczegółowej analizy identyfikacji obcych szczepów na plantacjach nasiennych sosny zwyczajnej, wykonanej na podstawie analizy polimorfizmu dwóch typów markerów genetycznych. Przedstawiona praca jest pierwszą tego typu analizą na plantacjach sosnowych w Polsce, zwłaszcza w aspekcie identyfikacji poprawności genotypów rosnących klonów, w oparciu o dwa typy markerów genetycznych: jądrowego mikrosatelitarnego DNA i białek izoenzymatycznych.

Formalna ocena pracy

Dysertacja liczy 94 strony i podzielona jest na **7 rozdziałów**: 1) Wstęp, 2) Cel badań i testowane hipotezy, 3) Materiał i Metody, 4) Wyniki, 5) Dyskusję, 6) Podsumowanie i

wnioski, oraz 7) Spis literatury. Dodatkowo, praca zawiera 3 załączniki, ilustrujące wyniki badań. W pracy brak streszczenia w języku polskim i angielskim.

We **Wstępie** (9 stron maszynopisu) przedstawiono następujące zagadnienia: początki i rozwój plantacji nasiennych w Polsce i Europie (rozdz. 1.1, 1.2 i 1.3), podstawowe założenia metodyczne rozmieszczenia klonów na plantacji nasiennej (rozdz. 1.4), możliwe błędy popełnione w momencie zakładania plantacji i ich weryfikacja (rozdz. 1.4 i 1.5), zastosowanie markerów molekularnych w genetyce drzew leśnych (rozdz. 1.6), oraz aspekty zmienności genetycznej „naturalnych” drzewostanów sosny w zestawieniu ze zmiennością genetyczną drzew rosnących na plantacjach nasiennych (rozdz. 1.7).

Autor przedstawił ogólny zarys problematyki współczesnej hodowli sosny zwyczajnej, podkreślając znaczenie wyboru klonów lub rodów przeznaczonych do produkcji nasion na plantacjach nasiennych i podkreślił, iż prawidłowo przeprowadzone nasadzenia odpowiednich klonów na plantacji nasiennej gwarantują uzyskanie nasion o wysokiej jakości hodowlanej. Przeszkodą ku temu są dwa główne rodzaje „zanieczyszczenia genetycznego” drzew rosnących na plantacji nasiennej, wynikające przede wszystkim z: 1) dopływu pyłku z sąsiednich drzewostanów, oraz 2) błędów popełnionych przy zakładaniu plantacji przy użyciu innych genotypów, niż planowane. Temu ostatniemu zagadnieniu Autor poświęcił niniejszą pracę.

Cel pracy został przedstawiony w czterech głównych punktach, które korespondują z czterema głównymi hipotezami badawczymi pracy, i dotyczą: 1) poziomu błędów na badanych plantacjach nasiennych oraz błędów na innych plantacjach nasiennych w Polsce, 2) analizy błędów 2-go typu na zmienność genetyczną plantacji, 3) wpływu błędów na efektywną liczbę klonów i 4) porównania siły dyskryminacji dwóch typów zastosowanych markerów genetycznych w identyfikacji błędów przypisania szczepów na badanej plantacji.

Szkoda, że już w tym miejscu Autor niejako z góry zakłada nieco wątpliwy charakter uzyskanych wyników badań, stwierdzając że zastosowane markery genetyczne mają charakter neutralny, zatem cyt. „nie wiadomo, w jakim stopniu ich zmienność charakteryzuje ogólną (genomową) zmienność genetyczną oraz jest skorelowana z cechami fenotypowymi dla których prowadzona jest hodowla selekcyjna”. Rola sekwencji mikrosatelitarnych w komórce nie jest do końca poznana. Istnieją doniesienia, że coraz więcej tzw. neutralnych alleli DNA jest powiązanych z genami kodującymi białka strukturalne lub funkcjonalne (cf. Karhu i in. 1996, Li i in. 2002, Selkoe i Toonen 2006), odpowiedzialne za podziały komórkowe oraz adaptację gatunku do różnych warunków środowiska. W kontekście przedstawionych badań, cecha neutralności wyżej wymienionych markerów genetycznych jest gwarantem poprawnego przeprowadzenia identyfikacji genotypu danego szczepu, niezależnie od panujących warunków na plantacji.

Rozdział **Materiał i metody** podzielono na trzy główne podrozdziały. W pierwszym opisano materiał badawczy, na który składały się próbki tkanek pobrane z drzew rosnących na trzech plantacjach nasiennych, zlokalizowanych w nadleśnictwach: Susz, Zdrojowa Góra i Pniewy. Materiał roślinny opisano podając wiek założenia plantacji, jej powierzchnię, pochodzenie szczepów, oraz badane kwatery, których plan zamieszczono w załącznikach na końcu pracy.

Weryfikację genotypów szczepów *P. sylvestris* przeprowadzono na podstawie analiz dla dwóch typów markerów (mikrosatelitarnego DNA jądrowego i białek izoenzymatycznych), z podaniem szczegółów laboratoryjnych dotyczących ich izolacji i detekcji.

Metody statystyczne opisano w 4 podrozdziałach, koncentrując się na: 1) zmienności i zróżnicowaniu genetycznym, 2) występowaniu alleli zerowych („null”) i obliczaniu frekwencji alleli loci mikrosatelitarnych, 3) obliczaniu prawdopodobieństwa uzyskania identycznego genotypu (P_{ID}) – tu proszę nanieść poprawkę, bo program

GenAEx *de facto* nie oblicza tego parametru, oraz 4) obliczaniu efektywnej liczby klonów.

Wyniki przedstawiono na 29 stronach, w 3 podrozdziałach, które dotyczyły głównych celów pracy, a mianowicie: 1) poziomu błędów przypisania szczepów na plantacjach nasiennych, 2) wpływu błędów przypisania szczepów na poziom zmienności genetycznej stosowanych markerów genetycznych (loci SSR i białka izoenzymatyczne), oraz 3) wpływu błędów na efektywną liczbę klonów na plantacjach. Wyniki badań zestawiono w formie 10-ciu tabel i 5-ciu rycin.

Do tego rozdziału mam następujące uwagi merytoryczne oraz pytania do Autora:

- w opisie wyników (Tabela 7) nie podano, czy współczynnik różnicowania międzypopulacyjnego (F_{ST}) obliczono po korekcie alleli zerowych? Dodatkowo, czy odchylenie od równowagi H-W definiowano tylko na podstawie wartości współczynnika wsobności (F_{IS}) ?

- proszę wyjaśnić, co oznacza stwierdzenie ze str. 28, cyt. „*Prawdopodobieństwo (chodzi o P_{ID}) zależy od poziomu polimorfizmu danego markera i kolejności, w jakiej wykorzystywany jest do obliczeń*” ?

- proszę zwrócić uwagę na konsekwentne nazywanie analizowanych wariantów w całej pracy, czyli **W0** i **WB** (nie **W1** ?),

- w pracy brak obliczeń istotności statystycznej dla parametrów zmienności genetycznej. Na ogół, przy stwierdzeniu, że dany parametr jest „istotny” zalecane jest podanie poziomu tej istotności (np. w Tabeli 9 i in.),

- na str. 41 przedstawiono w dość zawiły sposób interpretację poziomu różnicowania genetycznego dla badanych loci mikrosatelitarnych oraz wszystkich szczepów na badanych plantacjach (tabele 10a, 10b i 10c). Autor rozszerzył też wnioski o poziomie różnicowania genetycznego całych plantacji o wartości

parametrów F_{st} otrzymanych dla pojedynczych loci, w takim przypadku, należy porównywać średnią wartość F_{st} obliczoną dla wszystkich loci. Opis Tabeli 10b zawiera inny parametr genetyczny (F_{st}), niż omawiany G''_{st} w tekście (dla którego powinno być powołanie na Tabelę 10c),

- podobne uwagi dotyczą rozdziału omawiającego polimorfizm białek izoenzymowych, na str. 50 i 51. Tu również proszę o podanie poziomu istotności otrzymanych średnich wartości dla parametrów F_{st} i G_{st} , aby móc stwierdzić między nimi podobieństwo bądź różnice.

Rozdział **Dyskusja** zajmuje 11 stron i odnosi się do danych, przedstawionych w poprzednich rozdziałach dysertacji. Autor podsumował wyniki badań własnych oraz porównał je z wynikami przedstawionymi przez innych autorów, opisujących strukturę genetyczną sosny zwyczajnej (zarówno na plantacjach nasiennych, jak i w drzewostanach), w Polsce i Europie. Zabrakło może odniesienia do prowadzonych współcześnie badań nad identyfikacją wybranych loci cech ilościowych DNA (tzw. QTL) na plantacjach drzew leśnych. Pomimo trudności identyfikacji kodujących fragmentów genomu z powodu występowania loci QTL w układach multi-genowych, w niektórych krajach jest obecnie prowadzona selekcja, ukierunkowana na konkretne cechy hodowlane drzew takie, jak: zwiększona asymilacja związków azotowych (co gwarantuje lepsze przyrosty roczne np. u topoli), czy zwiększona odporność na patogeny i szkodniki owadzie (np. u brzozy).

Ciekawym wynikiem przedstawionych badań jest fakt, że na terenie wszystkich trzech analizowanych plantacjach nasiennych stwierdzono występowanie błędów przypisania szczepów (błąd 1-go typu), oraz występowanie obcych szczepów (błąd 2-go typu, sięgającego prawie 31% na plantacji Susz, założonej w 1977 roku). Podsumowanie wszystkich błędów wynikających z przeprowadzonej identyfikacji genotypów szczepów na badanych plantacjach przedstawiono w jednej zbiorczej tabeli, która wieńczy całość

przeprowadzonych analiz oraz powołuje się na wyniki podobnych badań innych autorów.

Na podstawie wyników badań własnych oraz badań innych autorów, Doktorant przedstawia genezę powstawania odmiennych genotypów szczepów i produkowanych przez nie nasion na sosnowych plantacjach nasiennych. Są to przede wszystkim dwa czynniki: błędy ludzkie w trakcie zakładania plantacji oraz zanieczyszczenie produkowanych nasion przez obcy pyłek pochodzący z blisko położonych drzewostanów. Autor poprawnie zinterpretował wpływ obecności alleli zerowych („null”) na wartość współczynnika wsobności (F_{IS}), który jest miarą niedoboru osobników heterozygotycznych w wyniku kojarzenia wsobnego.

W pracy poruszono ciekawy aspekt obecności „nowych” alleli na plantacjach, których pojawienie się jest określane jako wprowadzenie „nieprzewidywalnych” cech i może zaniżyć zakładany zysk hodowlany plantacji. Tym niemniej, w naturalnych drzewostanach sosnowych, obecność nowych alleli (w tym rzadkich i prywatnych) może być uznana jako korzystna z punktu widzenia zachowania większej różnorodności puli genetycznej oraz zdolności adaptacyjnej danego gatunku do zmiennych warunków środowiska. W drzewostanach o charakterze naturalnym, mają miejsce długofalowe naturalne procesy ewolucyjne, które zmierzają do lepszej adaptacji gatunku do lokalnie panujących warunków. Lepsze dostosowanie nie musi jednak zawsze oznaczać większej zmienności genetycznej (heterozygotyczności) populacji w konkretnie badanych loci. Naturalna selekcja może preferować osobniki homozygotyczne w jednych loci, a heterozygotyczne w drugich loci, zmniejszając przez to obciążenie genetyczne przez faworyzowanie „wyspecjalizowanych” alleli, odpowiedzialnych za korzystne cechy adaptacyjne populacji.

Wobec powyższych niewiadomych wydaje się, że w lasach gospodarczych priorytetem powinno być zachowanie możliwie największego zróżnicowania genetycznego, oznaczającego większą elastyczność populacji i możliwość adaptacji do

zmieniających się warunków klimatycznych i środowiskowych. W tym aspekcie, Autor prawidłowo zauważa, jak ważne jest zachowanie w miarę dużej liczby efektywnych klonów na plantacjach, gdyż ich potomstwo będzie wchodziło w skład przyszłych drzewostanów gospodarczych. Wydaje się zatem, że powyższe zagadnienia dotyczące zachowania puli genowej potomstwa pozyskiwanego ze szczepów rosnących na plantacjach nasiennych w Polsce, wymagają dalszych badań.

W **Podsumowaniu i wnioskach**, które ujęto w pięciu punktach, Autor nawiązał do postawionych na wstępie pracy hipotez. Neutralność zastosowanych w pracy markerów genetycznych okazała się atutem, gdyż umożliwiła przeprowadzenie porównania między genotypami teoretycznego zestawu szczepów wynikającego z planu plantacji (wersja „bez błędów” W0), z genotypami rzeczywiście występującymi na terenie plantacji (wersja „WB”).

Cytowana **Literatura** jest wystarczająca (aczkolwiek niekompletna) i zawiera ok. 135 pozycji krajowych i zagranicznych, w większości z ostatnich lat.

Pod względem merytorycznym pracę oceniam jako dobrą, z przyczyny na kompleksowy charakter podjętych badań genetycznych, przeprowadzonych dla szczepów sosny hodowanych na plantacjach nasiennych w Polsce. Uważam, że Autor przeprowadził poprawną analizę wpływu błędów na poziom zmienności genetycznej plantacji, poprzez zestawienie poziomu zmienności teoretycznej szczepów (wyjściowych, zwanych wersją W0), z genotypami szczepów „rzeczywiście” rosnącymi na plantacjach (czyli wersji WB). Stosując nowoczesne metody biologii molekularnej, Autor wykazał bardzo małe (średnio 0,1 procentowe) różnice w puli genowej plantacji z wersji teoretycznej (W0) oraz plantacji „zanieczyszczonej” obcymi genotypami (WB). Na poparcie tego wyniku, zabrakło tylko wykonania obliczeń poziomu istotności statystycznej parametrów genetycznych, otrzymanych dla każdego typu markera.

Najważniejszym osiągnięciem badań Pana mgr Pawła Przybylskiego jest rozwiązanie problemu zaprezentowanego w temacie rozprawy i w prawidłowo sformułowanych (choć nie oczywistych) założeniach hipotez badawczych. W świetle przedstawionych badań, wnioski zapisane w końcowej części rozprawy (jest ich 5) oraz 6 rekomendacji dla praktyki hodowlanej - mają charakter aplikacyjny w hodowli selekcyjnej sosny zwyczajnej.

W celu weryfikacji poprawności rozmieszczenia klonów na pojedynczej plantacji nasiennej Autor proponuje zastosowanie markerów polimorfizmu DNA mikrosatelitarnego (złożonego z 4 loci: Spac 11.6, Spag 7.14, PtTX 3107 i PtTX 4001), ale nie pomija możliwości zastosowania również 13 loci izoenzymatycznych.

Liczne błędy stylistyczne i edytorskie, na które natknęłam się przy uważnej lekturze maszynopisu, zaznaczyłam bezpośrednio w elektronicznej wersji pracy (płyta CD), która zostanie przekazana Autorowi. W całej dysertacji, należy zwrócić uwagę na błędy w interpunkcji (brak kropek na końcu zdań), pisownię nazw łacińskich gatunków roślin, oraz ujednoczenie pisowni nazwisk autorów cytowanych w pracy (np. Gömöry, González, Müller-Starck, Samoćko), brak numerów stron cytowanych prac, lub brak cytowanych autorów w Spisie Literatury, np. Li i Li (2012) ze str. 8, Neale i in. (2014) oraz Sia i in. (2000) ze str. 12, etc.

Czasami używany jest potoczny język (stosowany na co dzień w laboratorium), jak np. „mikrosatelitów”, „wniosek mówiący”, „w próbie nie daje się wykryć”, czy podano zbyt wiele szczegółów - cyt. „numer ten nadano próbówkom 15 ml z nakrętką typu Falcon”...

Przytoczone uwagi nie obniżają wartości naukowej dysertacji, ale mogą mieć znaczenie w trakcie publikacji wyników badań w czasopismach naukowych.

Wniosek końcowy:

Po uważnym przestudiowaniu przedstawionej rozprawy doktorskiej, stwierdzam że Pan mgr Paweł Przybylski przedstawił ciekawą koncepcję powiązania molekularnej charakterystyki puli genowej szczepów sosny zwyczajnej na plantacjach nasiennych z precyzyjnymi wytycznymi dla praktyki leśnej. Autor wykazuje się dobrą znajomością tematu, cytuje inne badania o podobnej tematyce, przeprowadzone na podstawie takich markerów genetycznych, jak: izoenzymy, RAPD, RFLP i SSR.

Biorąc pod uwagę powyższe uwagi i stwierdzenia, przesłana mi do recenzji rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Stopniach i Tytułach Naukowych, w związku z tym przedstawiam Wysokiej Radzie Instytutu Badawczego Leśnictwa w Sękocinie Starym wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Pawła Przybylskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Justyna A. Nowakowska