

Prof. dr hab. Maria Moś

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Doroty Blatsios

pt: „Zróżnicowanie kolekcji różaneczników (*Rhododendron* L.) pod względem wybranych cech

dekoracyjnych, użytkowych, polimorfizmu DNA oraz efektywności mikrorozmnażania”

wykonanej w Katedrze Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa pod kierunkiem

dr hab. Renaty Galek, prof. nadzw.

Różaneczniki są rodzajem z rodziny wrzosowatych, występujących prawie na wszystkich kontynentach i różnych szerokościach geograficznych. Rodzaj ten najliczniej występuje w Azji. W naszym kraju wzbudzają duże zainteresowanie, gdyż krzewy te posiadają atrakcyjne, duże kwiatostany, o zróżnicowanej barwie, które pięknie prezentują się w ogrodach przydomowych dodając im trochę egzotyki. Dużą zaletą różaneczników są też zimozielone liście. Wykorzystywane są również do nasadzeń w zieleni miejskiej, zarówno w parkach jak i ciągach komunikacyjnych, gdzie zimozielone liście mają duże znaczenie w ograniczaniu rozprzestrzeniania się zanieczyszczeń w dużych aglomeracjach. Stąd też podjęcie badań nad tym rodzajem daje nową, poszerzoną charakterystykę *badanych* genotypów, która może być wykorzystana przez hodowców w kreowaniu nowych odmian.

W krótkim wstępie Autorka przedstawia znaczenie różaneczników oraz możliwość otrzymywania nowych odmian. Zwraca uwagę na wykorzystanie technik *in vitro*, które pozwalają na uzyskanie dużej ilości jednolitych roślin w stosunkowo krótkim czasie. Uzasadnia również zastosowanie markerów molekularnych w hodowli różaneczników. Tak przedstawiony wstęp nawiązuje do precyzyjnie sformułowanego celu pracy.

W przeglądzie literatury Autorka wykazała się bardzo dobrą znajomością różaneczników (przedstawiła systematykę rodzaju *Rhododendron* L., zasięg ich występowania oraz charakterystykę roślin z uwzględnieniem ich cytogenetyki). Znaczącą część tego rozdziału poświęca hodowli różaneczników w różnych ośrodkach oraz kierunkom hodowli z wykorzystaniem transformacji genetycznych (m. in. dla zmiany pokroju roślin, polepszenia systemu korzeniowego), jak również hodowli w kierunku uzyskania odmian o dużych, pachnących kwiatach, cieplejszej barwie, długim okresie kwitnienia oraz hodowli odpornościowej. Przedstawiła również zastosowanie różaneczników nie tylko jako roślin ozdobnych, ale również oczyszczających powietrze szczególnie w miastach narażonych na

dużą koncentrację zanieczyszczeń powietrza i gleby. Ciekawym jest opis różaneczników jako roślin mających szerokie zastosowanie w medycynie, wskazała również na możliwość ich toksycznego działania. Omawiając metody hodowli roślin przedstawia metody tradycyjne w których wykorzystywane są różne części roślin do ukorzeniania, podając podłoża zalecane przez różnych badaczy. Szczególną uwagę zwraca na wykorzystanie metod biotechnologicznych. Szeroko omawia metody *in vitro*, które są techniką pozwalającą na przyspieszenie prac hodowlanych oraz uzyskanie mieszańców oddalonych. Przedstawia możliwość wykorzystania w tej metodzie różnych eksplantatów oraz pożywek z różnymi modyfikacjami. Wskazuje na możliwość poliploidyzacji dla ulepszenia cech dekoracyjnych różaneczników oraz do podwojenia liczby chromosomów mieszańców oddalonych. Podaje również przykłady transformacji u różaneczników. Szczegółowo omawia możliwość zastosowania różnych markerów molekularnych do oceny zróżnicowania i pokrewieństwa oraz charakteru mieszańcowego u różaneczników. Zakończeniem rozdziału przegląd literatury jest przedstawienie zmienności cech morfologicznych różaneczników wynikające ze zróżnicowania genetycznego na który mają wpływ m. in. mutacje, warunki świetlne, zmiany klimatyczne.

Materiałem badawczym były 8 letnie mieszańce różaneczników rosnące w Arboretum Leśnym im. prof. Stefana Białoboka w Sycowie. Badania obejmowały 3 letnie pomiary i obserwacje 75 okazów przeprowadzone w 3 terminach zgodnie z metodyką UPOV.. Obserwacje OWT wykonano dla 27 cech. Kolejnym etapem badań było rozmnażanie wegetatywne różaneczników *in vivo*. Następnie wytypowano 2 obiekty najlepiej ukorzeniające się do badań *in vitro*. Dla każdego obiektu wykorzystano 2 rodzaje eksplantatów oraz pożywkę z różnymi układami regulatorów wzrostu (7 kombinacji). Do oceny zróżnicowania badanych okazów przeprowadzono badania polegające na ustaleniu stopnia polimorfizmu na poziomie DNA z wykorzystaniem markerów ISSR (zastosowano 23 startery ISSR). Kolejne etapy badań zostały bardzo dobrze przemyślane i zaplanowane, a następnie opracowane z wykorzystaniem dobrze dobranych metod statystycznych. Bardzo oryginalną częścią pracy jest rozdział pt „Badania opinii”, który w przypadku badanych roślin może być ważną wskazówką dla hodowców.

Charakterystykę 75 okazów różaneczników przeprowadzono na podstawie obserwacji i pomiarów 37 cech, które uwzględniały wysokość i pokrój krzewów, cechy liści, kwiatów, kwiatostanów oraz terminu kwitnienia. Wyniki opracowano na podstawie jednoczynnikowych analiz wariancji i bardzo szczegółowo opisano wskazując okazy o skrajnych cechach, które mogą zostać wykorzystane przez hodowców i wzbudzić zainteresowanie użytkowników. Zależności badanych cech mieszańców przedstawiono w formie macierzy korelacji. Autorka zinterpretowała współczynniki korelacji o niezbyt wysokich wartościach. Szkoda, że nie odniosła się do zależności, których współczynniki korelacji przyjmowały najwyższe wartości. Należały do nich m. in. zależności pomiędzy wysokością roślin początkową i końcową ($r=0.97$), czy szerokością roślin początkową i

końcową ($r=0.98$). Macierz korelacji przedstawiona w tab.16 zawiera pewne nieścisłości, natomiast wykres nr 27 został prawidłowo przedstawiony.

Kolejnym etapem opracowania wyników była analiza składowych głównych, która wykazała, że 12 pierwszych składowych wyjaśnia 72% całkowitej zmienności. Przedstawienie graficzne rozproszenia badanych obiektów w układzie dwóch pierwszych składowych, które decydują o pokroju roślin oraz walorach ozdobnych wynikających z cech kwiatów i liści pozwoliło na wskazanie okazów, które mogą posłużyć do wyhodowania odmian o nowych, niespotykanych cechach.

Zastosowanie analizy skupień umożliwiło pogrupowanie badanych 75 mieszańców pod względem podobieństwa na podstawie analizowanych cech. Wyodrębniono 3 wyraźnie różniące się grupy mieszańców pod względem wysokości i szerokości początkowej i końcowej krzewów, które mogą znaleźć zastosowanie do różnych nasadzeń (parków, ogrodów, tarasów). Grupy te charakteryzowały się również zróżnicowanym terminem kwitnienia.

Rozmnożenie wegetatywne różaneczników *in vivo* pozwoliło na wyselekcjonowanie genotypów u których uzyskano najwyższy procent ukorzenia (od 75-100%). Genotypy te stanowiły materiał do rozmnożenia w kulturach *in vitro*. Jest to bardzo wartościowa część pracy, która pozwala na opracowanie procedury rozmnażania różaneczników przydatnej dla hodowli. Wyniki mikrorozmnażania zostały bardzo szczegółowo opracowane z wykorzystaniem jedno-, dwu- i trzy czynnikowych analiz wariancji w których przedstawiono wpływ genotypu, rodzaju eksplantatu i składu pożywki oraz współdziałania badanych czynników na wysokość roślin i liczbę liści na pędzie głównym wyprowadzonych w kulturach *in vitro*. Najwięcej przydatnych informacji dostarczyła 3 czynnikowa analiza wariancji w której stwierdzono istotne współdziałanie wszystkich badanych czynników na wysokość roślin i ilość liści na pędzie głównym. Na wysokość roślin miał również istotny wpływ genotyp oraz współdziałania: genotypu z rodzajem eksplantatu i genotypu z pożywką. Natomiast na ilość liści na pędzie głównym istotny wpływ stwierdzono dla pojedynczych czynników: rodzaju eksplantatu i pożywki. Przeanalizowanie średnich wartości pozwoliło na wskazanie najlepszego rodzaju eksplantatu i składu pożywki do rozmnażania w kulturach *in vitro* badanych genotypów. Jednak dla uzyskania wysokich roślin, dobrze ulistnionych różne genotypy wymagają innej koncentracji regulatorów wzrostu w pożywce. W rozdziale tym występują pewne nieścisłości w zestawieniach średnich przy podziale na grupy jednorodne (tab. 25, 27, 29, 30, 34, 41).

Interesującym rozszerzeniem pracy była analiza zróżnicowania genetycznego z wykorzystaniem markerów ISSR. Na podstawie danych molekularnych wyodrębniono 7 klastrów pod względem podobieństwa. Klastry te różniły się liczebnością obiektów, a w ich obrębie zaobserwowano bardzo duże zróżnicowanie pod względem cech fenotypowych,

które uniemożliwia badanie zależności pomiędzy wyglądem okazów a ich charakterystyką molekularną.

Bardzo oryginalnym rozszerzeniem pracy jest rozdział pt. "Badanie opinii", w którym użytkownicy różaneczników wskazali cechy najbardziej interesujące takie jak: barwa kwiatów, liści oraz termin i długość kwitnienia. Opinie te mogą być ważną wskazówką dla hodowców, którzy mogą uzyskać nowe kreacje interesujące dla użytkowników odmian.

Omówienie wyników zostało bardzo dobrze opracowane statystycznie i udokumentowane w 46 tabelach (brak tab. 45), na 36 wykresach i 21 zdjęciach, które świadczy o dużej umiejętności Doktorantki do przedstawiania wyników.

Interesującym rozdziałem jest dyskusja wyników. Prawidłowe jej przeprowadzenie świadczy o znajomości literatury przedmiotu i umiejętności jej wykorzystania. Autorka porównała fenotypy badanych mieszańców do odmian znajdujących się na międzynarodowej liście rododendronów (RHS) oraz wskazała mieszańce nie spotykane na tej liście, które mogą stanowić nowe, ciekawe odmiany. Skonfrontowała wyniki własne z badaniami innych autorów dotyczące rozmnażania wegetatywnego zwracając uwagę na termin pobierania sadzonek oraz rodzaj i stężenie substancji indukujących tworzenie korzeni. Bardzo szczegółowo przedstawiła zastosowanie w kulturach *in vitro* pożywki Andersona z różnymi modyfikacjami. Wskazała rozbieżności wyników własnych z cytowaną literaturą wynikające m. in. z różnych kombinacji i koncentracji zastosowanych regulatorów. Przedstawia przydatność stosowania markerów ISSR do oceny zróżnicowania genetycznego różaneczników. Nie potwierdzono jednak w prowadzonych badaniach zależności pomiędzy cechami morfologicznymi a charakterystyką molekularną, którą wykazano w cytowanej literaturze.

W przeglądzie literatury i dyskusji wykorzystano 165 pozycji literatury krajowej i zagranicznej. Publikacje krajowe są nieliczne, stąd oceniana praca jest cennym rozszerzeniem wiedzy o mieszańcach różaneczników znajdujących się w Arboretum Leśnym im. prof. Stefana Białoboka w Sycowie.

Uzyskane wyniki pozwoliły na sformułowanie dobrze udokumentowanych wniosków, które odpowiadają założonemu celowi. Najbardziej wartościowe w pracy jest wskazanie mieszańców o skrajnych cechach morfologicznych, genotypów łatwo rozmnażających się wegetatywnie oraz opracowanie pożywki, która może być uniwersalną do rozmnażania różaneczników w kulturach *in vitro*. Istotnym jest również przedstawienie zainteresowań użytkowników różaneczników.

W pracy występują drobne błędy literowe oraz pewne nieścisłości w tabelach, które zostały zaznaczone w tekście. Błędy te nie umniejszają wartości pracy.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona praca pod względem formalnym została prawidłowo przygotowana, napisana jest poprawnie i posiada typowy układ dla prac doktorskich. Jej wysoki poziom merytoryczny wynika z dobrze zaplanowanych badań i konsekwentnej ich realizacji sprawił, że Doktorantka osiągnęła zaplanowany cel.

Rozprawa Pani mgr inż. Doroty Blatsios pt. "Zróżnicowanie kolekcji różaneczników (*Rhododendron* L.) pod względem cech dekoracyjnych, użytkowych, polimorfizmu DNA oraz efektywności mikrorozmnażania" spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie Rolnictwo i Ogrodnictwo. Jednocześnie chciałam podkreślić, że przedstawiona praca jest kompleksowym opracowaniem o dużej wartości poznawczej i użytecznej dla różaneczników. Wyniki tych badań mogą zostać wykorzystane w programach hodowlanych, a przeprowadzona ankieta wśród użytkowników różaneczników może być wskazówką dla hodowców do uzyskania nowych odmian. Dlatego też z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie pracy Pani mgr inż. Doroty Blatsios do publicznej obrony.

Kraków, 14. 02. 2020 r.

Prof. dr hab. Maria Moś