

Prof. dr hab. Maria Klein  
Emerytowany profesor  
Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr. Abdel-Rahman Mustafa Abdel-Wahab Mohammeda  
pt. „The genetic map of strawberry (*Fragaria x ananasa*) based on ‘Elsanta’ x ‘Senga  
Sengana’ mapping population”**

wykonanej w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach  
pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Korbin

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej Pan mgr Abdel-Rahman Mustafa Abdel-Wahab Mohammed podjął się opracowania mapy genetycznej truskawki, rośliny o dużym znaczeniu gospodarczym nie tylko w Polsce, ale także w Egipcie - kraju macierzystym Doktoranta. Tematyka pracy wpisuje się w bardzo ważny obecnie nurt badań molekularnych, których celem jest poznanie genomów roślin uprawnych. Uzyskana wiedza dotycząca lokalizacji markerów i sprzężonych z nimi genów ma duże znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Pozwala bowiem zrozumieć budowę i funkcjonowanie genomu i może być wykorzystywana do usprawnienia procesu selekcji i hodowli nowych odmian. Prace nad mapowaniem genomów roślin z rodzaju *Fragaria* rozpoczęły się *de facto* w pierwszej dekadzie XXI wieku. W badaniach tych bazowano głównie na diploidalnych gatunkach i wyprowadzonych populacjach F<sub>2</sub>. Rozpoczęto wówczas również prace nad mapowaniem genetycznym truskawki, która jest oktoploidem, w związku z czym sporządzenie mapy genomu tego gatunku jest niezwykle trudne. W wyniku badań, przeprowadzonych przez Doktoranta pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Korbin, sporządzona została pierwsza w Polsce mapa genetyczna *Fragaria x ananasa*, obejmująca 30 grup sprzężeń, ze 116 loci SSR. Otrzymaną mapę uważam za wartościowy wkład w poznanie struktury genomu truskawki i cenną bazę dla dalszych prac nad lokalizacją genów kodujących ważne dla tego gatunku cechy użytkowe.

Praca doktorska Pana Abdel-Rahman Mustafa Abdel-Wahab Mohammeda, napisana w języku angielskim, jest zwięzłym opracowaniem liczącym 108 stron, o konstrukcji typowej dla rozpraw z zakresu nauk rolniczych. W wydzielonych 9 rozdziałach syntetycznie przedstawiono wykonane badania zaczynając od naświetlenia problemu, podania celu i

metodyki badań, poprzez pokazanie wyników i ich dyskusji, na spisie literatury (186 pozycji), podsumowaniu pracy i wnioskach z niej wynikających kończąc. Pracę uzupełnia aneks, w którym znajduje się wykaz skrótów, zestawienie tabelaryczne użytych starterów mikrosatelitarnych i skład chemiczny mieszanin/ buforów wprowadzonych do badań. Podano także, zgodnie z wymogami, streszczenie pracy w języku polskim i języku angielskim.

Praca doktorska została zaprojektowana w sposób liniowy, narastający. W oparciu o populację mapującą  $F_1$  (CP), otrzymaną w wyniku skrzyżowania odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz zgodnie ze stosowaną w tego typu pracach procedurą Doktorant kolejno:

- scharakteryzował polimorfizm genetyczny roślin obu odmian, co było podstawą do ich doboru jako form rodzicielskich, właściwych dla pozyskania populacji mapującej CP i prowadzenia prac nad mapą sprzężeń,
- przeprowadził pełną analizę polimorfizmu w obrębie populacji mapującej,
- scharakteryzował typy segregacji alleli polimorficznych w w/w potomstwie,
- ocenił frekwencję rekombinacji,
- określił położenie i orientację markerów mapowych,
- wytypował, w oparciu o analizę bioinformatyczną, grupy sprzężeń stanowiących mapę,
- wygenerował graficzny obraz mapy,
- przeprowadził analizę porównawczą uzyskanej mapy z mapami referencyjnymi.

**Przegląd literatury** liczy 9 stron i zawiera podstawowe informacje dotyczące badanego obiektu, czyli truskawki, w tym pochodzenie, interakcje filogenetyczne i kierunki hodowli tego gatunku oraz stan badań nad mapowaniem genomu roślin z rodzaju *Fragaria*. Omówione zostały także rodzaje map genomowych, metody ich sporządzania oraz zasady rządzące mapowaniem. W rozdziale tym Doktorant cytował liczne publikacje naukowe, opisujące zagadnienia związane z analizą genomów różnych gatunków roślin, w tym szczególnie roślin należących do rodzaju *Fragaria*. Świadczy to o znajomości przedmiotu i warsztatu metodycznego, wykorzystanego następnie w pracy badawczej.

Rozdział **Materiały i metody** dostarcza informacji o przebiegu eksperymentów, które zgodnie z celem pracy dotyczyły dwóch grup zagadnień. W pierwszej części pracy opracowano mapę genetyczną truskawki w oparciu o ustalone pozycje wytypowanych markerów mikrosatelitarnych SSR. W drugiej porównano utworzoną mapę z mapami referencyjnymi, sporządzonymi dla diploidalnej poziomki *Fragaria vesca* oraz mapy oktoploidalnych przedstawicieli rodzaju *Fragaria*.

Do analiz polimorfizmu Autor wybrał losowo 149 markerów SSR, zidentyfikowanych i opublikowanych uprzednio dla roślin z rodzaju *Fragaria* przez różnych autorów, zajmujących się sekwencjami mikrosatelitarnymi. Populacja E x SS obejmowała 104 rośliny, co stanowi liczbę wystarczającą do sporządzenia mapy genetycznej, przy określonym przez doktoranta heterozygotycznym statusie badanej populacji. Opis użytych przez doktoranta technik izolacji materiału genetycznego, jego amplifikacji, rozdziału i wizualizacji uzyskanych amplikonów jest prawidłowy i nie budzi wątpliwości. W dalszej części metodyki Autor omówił sposoby analizowania danych uzyskanych dla genomu oktoploidalnego oraz sposoby ich weryfikacji i stosowane podczas konstruowania mapy sprzężeń narzędzia tj. funkcje matematyczne oraz programy komputerowe (JOINMAP 3,0 i MapChart v.2.0), co także nie budzi zastrzeżeń. W metodyce zabrakło natomiast bardziej szczegółowych danych na temat obiektów użytych w pracy. Nieliczne informacje na ten temat można znaleźć dopiero w rozdziale Dyskusja. Chciałabym również usłyszeć, czym się kierował Doktorant wybierając metodę rozdziału markerów SSR w żelu poliakrylamidowym, zamiast bardziej precyzyjnej metody elektroforezy kapilarnej? Nie znalazłam też informacji, czy w analizach molekularnych stosowano powtórzenia, co ułatwiłoby analizę trudnych do scharakteryzowania amplikonów.

**Wyniki**, obejmujące 50 stron, przedstawione zostały, zgodnie z zasadami przyjętymi przy sporządzaniu map genetycznych w formie 4 zbiorczych tabel (w tym tabel wynikających z zastosowania funkcji matematycznych), z krótkimi opisami. Wzbogaciły je poglądowe elektroforetogramy, pokazujące polimorfizm genetyczny form rodzicielskich w reakcji z 10 wybranymi starterami oraz segregację alleli w reakcji z pojedynczą parą starterów dla 104 pojedynków pochodzących z populacji mapującej. W oparciu o przedstawione w tabelach dane wygenerowany został graficzny obraz mapy genetycznej E s SS. Graficznie przedstawiono także zależności między lokalizacją/ orientacją markerów uzyskanych na mapie E x SS z ich położeniem na opublikowanych mapach referencyjnych, które odwzorowano z danych literaturowych. Łącznie wyniki badań przedstawiono na 12 rycinach.

W ramach realizowanego przez Pana Abdel-Rahman Mustafę Abdel-Wahab Mohammeda projektu na matrycy DNA form rodzicielskich 'Elsanta' i 'Senga Sengana' zostało wygenerowanych 346 amplikonów, z których 297 było polimorficznych. Autor potwierdził, że markery molekularne SSR mogą być skutecznie wykorzystane do genotypowania populacji mapującej oktoploidalnego gatunku, jakim jest truskawka. Skonstruowana mapa genetyczna E x SS obejmowała 116 loci zlokalizowanych w 30 grupach sprzężeń ( $7n \times 4 + 2$  dodatkowe LG), o łącznej długości 1450,4 cM. Niezwykle wartościową

częścią pracy było także porównanie utworzonej mapy z mapami referencyjnymi. Autor wykazał zgodność, a także przypadki niezgodności położenia wygenerowanych loci w stosunku do map referencyjnych dla rodzaju *Fragaria*, tj. mapy FV x FB (2x) i mapy RG x H (8x). Uzyskane wyniki pokazują, jak istotne jest posiadanie dobrze zaprojektowanej mapy genetycznej w sytuacji, gdy zespół naukowy zamierza prowadzić badania nad interakcjami między genami kodującymi cechy użytkowe, ważne w ukierunkowanym programie hodowli.

Rozdział **Dyskusja** liczy 10 stron i jest bardzo dobrze opracowana. Autor kolejno omówił w niej wyniki uzyskane w poszczególnych etapach pracy, porównując je z wynikami innych autorów. W oparciu o szeroką gamę publikacji, przeprowadził dyskusję, m. in. nad doborem populacji mapującej, markerów mikrosatelitarnych, liczbą uzyskanych grup sprzężeń oraz sposobem konstruowania map genomu oktoploidalnego, a także nad przyczynami rozbieżności w lokalizacji i orientacji loci markerów SSR między mapami okto- i diploidów oraz oktoploidów o odrębnym statusie genetycznym. Przedstawiona dyskusja świadczy zarówno o umiejętności analize, jak i właściwego cytowania literatury przez Doktoranta, który w swoich rozważaniach wykorzystał kluczowe publikacje dotyczące mapowania genomów, w tym genomu truskawki i pokrewnych gatunków, z przewagą prac publikowanych w ostatnich latach.

Na zakończenie Doktorant dokonał **Podsumowania** swojej pracy i wynikających z niej osiągnięć w sześciu obszernych punktach. W tej części została też krótko scharakteryzowana uzyskana mapa sprzężeń i jej interakcje z mapami referencyjnymi, w tym zarówno konserwatywny jak i ewolucyjnie zmienny charakter niektórych markerów. Dodatkowo Autor przedstawił cztery **Wnioski**. Według mojej opinii wniosek nr 1 jest należy zawęzić, gdyż Autor nie badał zróżnicowania morfologicznego użytych do badań odmian. Wniosek nr 4 jest natomiast zbyt enigmatyczny – wiadomo, że każdy dodany element mapy jest jej wzbogaceniem i może przyczynić się do ułatwienia hodowli. Przy przygotowywaniu publikacji do druku Doktorant powinien jeszcze raz przemyśleć wnioski wynikające z przeprowadzonych badań.

Strona redakcyjna przedłożonej pracy wymaga dopracowania. Ujednolicenia i uzupełnienia wymaga spis publikacji (np. przy podaniu techniki barwienia zeli powołano się na metodę opracowaną przez Benbouza i in. 2006, a w spisie literatury brakuje tej pozycji). Wystąpiły też błędy w cytowaniach (nazwiska autorów/ rok publikacji). Zauważone błędy zaznaczyłam w maszynopisie pracy i są do wglądu dla Doktoranta.

Utworzona mapa jest pierwszą w Polsce mapą genetyczną truskawki i pierwszą w świecie mapą odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'. Mapowanie genomów roślin sadowniczych, w tym gatunków poliploidalnych, jest bardzo trudnym wyzwaniem ze względu na ich specyficzny charakter i trudności z uzyskaniem populacji segregujących oraz analizą zjawisk w nich zachodzących. Uzyskane wyniki uważam za bardzo wartościowe dla nauki. Doktorant przygotował zagęszczony szkielet genomu truskawki, dzięki czemu można będzie w przyszłości kontynuować badania nad saturacją mapy i zmapowaniem genów istotnych dla polskiej hodowli. Jest to ważny kierunek badawczy, gdyż nowoczesna hodowla roślin powinna opierać się na znajomości budowy genomu, lokalizacji i interakcjach segregacyjnych genów kodujących ważne użytkowe. W nawiązaniu do tego, chciałabym usłyszeć, jak Doktorant widzi dalsze praktyczne wykorzystanie szkieletu mapy utworzonego w oparciu o dwie znane i cenione w produkcji odmiany truskawki 'Elsanta' i 'Senga Sengana' oraz czy wiedza na ten temat i doświadczenie zdobyta w czasie pobytu w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach będą przydatne (i w jakim zakresie) w Jego dalszej pracy w Egipcie.

Reasumując, przedstawiona do recenzji rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podwaliny dla wykorzystania aplikacyjnego. Przeprowadzone badania poszerzają wiedzę o budowie genomu truskawki, a zawarte w recenzji uwagi (głównie redakcyjne) nie wpływają na wartość pracy. Doktorant wykazał się podczas realizacji pracy bardzo dobrą znajomością literatury z zakresu mapowania genomów, świetną znajomością warsztatu molekularnego oraz umiejętnością prowadzenia badań i analizowania wyników uzyskanych w doświadczeniach, także przy użyciu skomplikowanych narzędzi bioinformatycznych. W wyniku przeprowadzonych przez Doktoranta badań powstała cenna baza do dalszych prac nad saturacją mapy genomu truskawki.

W związku z powyższym 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. 2003 Nr 65, poz. 595, z późn. zm., nowelizacja Dz. U. 2011 nr 84 poz. 455, Dz. 2014. poz. 1198 z 2014). Wnioskuje do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Abdel-Rahman Mustafa Abdel-Wahab Mohammeda do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



prof. dr hab. Maria Klein

Kraków, 27 listopada 2014 roku