

dr hab. Edyta Paczos-Grzęda, prof. uczelni
Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin

Lublin, 31.08.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr inż. Martyny Sobczyk

pt. „Występowanie genów męskiej sterility w wybranych populacjach żyta ozimego oraz poszukiwanie markerów molekularnych sprzężonych z pobocznymi genami przywracającymi płodność w systemie CMS-C”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Martyny Sobczyk została zrealizowana pod kierunkiem Pana dr hab. inż. Stefana Stojalowskiego, profesora ZUT w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydziału Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Obiektem badań prowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej jest ozima forma żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.). Gatunek ten jest ważną rośliną uprawną w Europie Środkowej i Wschodniej, a jego znaczenie gospodarcze jest szczególnie istotne w Polsce. Przystosowanie żyta do wzrostu w warunkach glebowych niekorzystnych dla innych zbóż, duża tolerancja na stresy biotyczne i abiotyczne, możliwość uprawy w warunkach minimalnych nakładów produkcyjnych, a także popyt na ziarno sprawiają, że pomimo obserwowanego w poprzednich dekadach spadku, areal jego uprawy w Polsce utrzymuje się w ostatnim czasie na mniej więcej stałym poziomie 700 – 800 tys. ha. Ziarno żyta ze względu na walory odżywcze i prozdrowotne wynikające m.in. z zawartości błonnika pokarmowego, minerałów takich jak cynk, żelazo czy potas, a także szeregu związków bioaktywnych jest cennym surowcem w przemyśle spożywczym. Prace hodowlane, a szczególnie wprowadzenie do uprawy odmian mieszańcowych, przyczyniły się do postępu w plonowaniu. W Polsce nadal w uprawie dominują odmiany populacyjne pomimo, że na liście odmian roślin rolniczych COBORU przeważają odmiany mieszańcowe. Warunkiem uzyskania odmian mieszańcowych jest dysponowanie szerokim wachlarzem kompatybilnych linii męskosterylnych, dopełniających i restorerowych. Obecnie w rejestrze odmian dominują odmiany oparte na systemie męskiej sterility typu Pampa, jak zaznacza Doktorantka, prowadzi to do zawężenia zmienności genomów cytoplazmatycznych. Co prawda genomy mitochondrialny i chloroplastowy są niewielkie, a liczba kodowanych przez oba genomy genów jest również znikoma, w porównaniu z genomem jądrowym, niemniej jednak współczesna wiedza nie pozwala nam jednoznacznie stwierdzić, czy działania zawężające zmienność genomów organellarnych nie



doprowadzą do katastrofalnych dla gatunku uprawnego skutków. Stąd rozwiązanie jakie przedstawia Doktorantka, polegające na wykorzystaniu alternatywnego dla Pampa systemu Vavilovii, a dokładniej cytoplazmy typu C, wydaje się w dalszej perspektywie niezwykle ważne i pożądane. Zastosowanie systemu Pampa w hodowli nowych odmian mieszańcowych jest stosunkowo proste z uwagi na rozpowszechnienie materiałów posiadających ten typ cytoplazmy. Od kilkadziesiąt lat wyprowadzane są jednocześnie linie dopełniające i restorerowe, a towarzyszy temu duże doświadczenie naukowców i hodowców w pracy z tym systemem warunkowania męskiej sterility. Zastosowanie cytoplazm typu Vavilovii jest mało popularne i ma charakter niszowy stąd zasób wiedzy na temat jego zalet i wad oraz sposobów przewycięzania problemów w pracy w tym systemie jest ograniczony. Tym bardziej należy podkreślić istotny wkład Doktorantki oraz pracowników Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin ZUT w Szczecinie, w tym wychowanków Prof. Mirosława Łapińskiego – pioniera tej tematyki badawczej, w rozwój zagadnienia jakim jest wykorzystanie cytoplazm innych niż Pampa w tworzeniu odmian mieszańcowych żyta. Reasumując, tematyka badawcza podjęta przez doktorantkę jest bardzo aktualna i znacząca dla dyscypliny naukowej rolnictwo i ogrodnictwo.

Struktura pracy

Rozprawę doktorską mgr inż. Martyny Sobczyk stanowi monografia naukowa. Praca liczy 122 strony. Wydzielono w niej rozdziały typowe dla prac z zakresu nauk przyrodniczych niemniej jednak poszczególnym rozdziałom nie nadano numerów, co trochę utrudnia poruszanie się po pracy. Na początku rozprawy umieszczono wstęp, w którym opisano znaczenie gospodarcze żyta, omówiono źródła cytoplazm sterylizujących oraz progres w hodowli odmian mieszańcowych żyta. Wstęp stanowi syntetyczne wprowadzenie w tematykę badawczą podjętą w pracy doktorskiej i sygnalizuje wszystkie istotne zagadnienia, których dotyczą prowadzone badania. Następnie przedstawiono hipotezę badawczą oraz zwięźle i precyzyjnie sformułowano trzy cele pracy. Przegląd literatury liczy 17 stron. Autorka w pięciu podrozdziałach omówiła pochodzenie, systematykę, cechy morfologiczne i fizjologiczne żyta, znaczenie gospodarcze żyta ozimego, zagadnienie cytoplazmatycznej męskiej sterility, hodowlę odmian mieszańcowych oraz zastosowanie markerów molekularnych w pracach nad tym gatunkiem. Wykorzystany w pracy materiał i metody zostały szczegółowo opisane w kolejnym rozdziale, który obejmuje 15 stron i 10 podrozdziałów. Autorka opisuje w nich metodykę oceny płodności roślin, proces uzyskiwania mieszańców i wyprowadzania populacji mapującej, a także metody laboratoryjne takie jak izolacja DNA czy techniki markerowe SCAR, COS i DArTseq oraz sposób prowadzenia analiz statystycznych i bioinformatycznych uzyskanych wyników. Dodatkowo zmodyfikowany protokół izolacji DNA roślinnego metodą CTAB znajduje się w rozdziale „Załączniki”. Kolejny, liczący 34 strony, rozdział prezentuje wyniki i stanowi zasadniczą część pracy. W siedmiu podrozdziałach z 13 tabelami i 9 rysunkami oraz dodatkowo w 12 tabelach umieszczonych na 18 stronach rozdziału „Załączniki” Autorka opisuje wyniki eksperymentów.



Otrzymane rezultaty są logicznie uporządkowane i czytelnie przedstawione, a dotyczą kolejno identyfikacji typu cytoplazm z wykorzystaniem markerów SCAR, oceny zdolności wybranych polskich i europejskich populacyjnych odmian żyta do przywracania płodności w systemach CMS-C i CMS-P, identyfikacji i mapowania pobocznych jądrowych genów restorerowych w systemie CMS-C oraz opracowania markerów dla tych genów. Stanowiąca kolejny rozdział dyskusja obejmuje 12 stron i w sposób syntetyczny, ale wyczerpujący dostarcza interpretacji wyników w oparciu o literaturę przedstawiając je w szerszym kontekście. Wyodrębniono w niej trzy podrozdziały, w których Autorka komentuje wyniki dotyczące (1) identyfikacji cytoplazm w europejskich populacjach żyta, (2) przywracania męskiej płodności przez odmiany populacyjne żyta linom z cytoplazmą sterylizującą C i P oraz (3) identyfikacji genów restorerowych w populacji mapującej wytworzonej na potrzeby niniejszej pracy. Podobnie jak pozostałe części rozprawy, „Dyskusja” została zorganizowana starannie i w przemyślanej formie. W rozdziale „Podsumowania i wnioski” sformułowano 6 punktów stanowiących poprawną rekapitulację uzyskanych wyników. Zgodnie ze sformułowanymi celami i hipotezami badawczymi wskazują one na występowanie cytoplazm sterylizujących w odmianach współczesnych i ich brak w odmianach historycznych, większą skuteczność odmian współczesnych, w porównaniu do historycznych w przywracaniu płodności, szczególnie w systemie CMS-C. Ponadto właściwie wyprowadzona populacja mapująca, nie zawierająca głównego genu restorerowego *Rfc1* umożliwiła zarówno identyfikację dwóch nieznanych wcześniej genów pobocznych odpowiedzialnych za przywracanie męskiej płodności, jak również opracowanie markera sprzężonego z jednym z tych genów położonym na chromosomie 2R. Kolejne dwa rozdziały to streszczenie wraz ze słowami kluczowymi w języku angielskim oraz jego wersja polskojęzyczna. Należy zaznaczyć, że streszczenie jest zwięzłe, klarowne i zawiera wszystkie niezbędne informacje, zaś wersja w języku polskim odpowiada wersji w języku angielskim. W następującym kolejno rozdziale „Załączniki” zamieszczono wspomnianą już wcześniej dodatkową dokumentację uzyskanych wyników. Jako następne rozdziały pojawiają się „Spis tabel” oraz „Spis rysunków” wyszczególniające po 17 elementów. Pracę kończy „Spis literatury” obejmujący 155 pozycji piśmiennictwa, głównie angielskojęzycznych, opublikowanych w przeważającej większości po roku 2000. Wykorzystany przez Autorkę zestaw publikacji niewątpliwie świadczy o jej bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym do prowadzenia badań.

Podsumowując ocenę metodyczną rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że opracowano ją prawidłowo. Oprócz kilku błędów interpunkcyjnych moją uwagę zwróciły jedynie tzw. „sieroty”, czyli pojedyncze litery, najczęściej spójniki, a także przyimki czy liczebniki pozostawione na końcu linijek tekstu. Warto pokreślić, że liczba błędów edycyjnych jest znikoma, co świadczy o dużej staranności przygotowania manuskryptu.

Merytoryczna ocena pracy

Punktem wyjścia przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej były następujące hipotezy badawcze: (1) U żyta ozimego z cytoplazmą sterylizującą C, oprócz głównego genu



restorerowego na chromosomie 4R, występuje jeden lub więcej pobocznych genów odpowiedzialnych za przywracanie męskiej płodności. (2) Zlokalizowanie genów pobocznych i opracowanie sprzężonych z nimi markerów molekularnych zwiększy skuteczność prac hodowlanych. (3) Obecność efektywnych genów przywracających męską płodność w populacjach żyta jest oczekiwana tam, gdzie występują cytoplazmy sterylizujące. (4) Brak występowania cytoplazmy sterylizującej w populacji powoduje, że allele dopełniające (non-restorer) nie podlegają negatywnej selekcji. W celu weryfikacji postawionych hipotez sformułowano następujące cele badawcze: (1) Poszerzenie wiedzy na temat występowania cytoplazm sterylizujących w europejskich populacjach żyta ozimego. (2) Ocena frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności w wybranych europejskich populacjach żyta ozimego (3) Określenie chromosomowej lokalizacji pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C oraz próba identyfikacji sprzężonych z w/w genami markerów molekularnych. Realizując wytyczone cele Doktorantka uzyskała wyniki, w których dokonała: (1) identyfikacji cytoplazm sterylizujących oraz (2) oceny frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności w wybranych europejskich odmianach populacyjnych żyta ozimego, a także (3) określiła chromosomową lokalizację pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C oraz opracowała marker molekularny dla jednego z tych genów. Badania wymagały od Autorki opracowania nowych metodyk i ogromnego nakładu pracy, zarówno na etapie eksperymentów polowych, jak i laboratoryjnych.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Martynty Sobczyk uznają: (1) Stwierdzenie obecności różnych typów cytoplazm w polskich i europejskich, historycznych i współczesnych odmianach populacyjnych żyta z wykorzystaniem markerów SCAR. (2) Wykazanie, zgodnie z wcześniejszymi hipotezami, braku obecności cytoplazmy sterylizującej typu Pampa w europejskich odmianach historycznych żyta ozimego. (3) Stwierdzenie obecności różnych typów cytoplazm w obrębie poszczególnych badanych odmian żyta. (4) Oszacowanie frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności i wykazanie zróżnicowania w polskich i europejskich odmianach populacyjnych żyta ozimego pod względem zdolności do przywracania męskiej płodności. (5) Wykazanie efektywniejszego przywracania płodności u mieszańców z cytoplazmą sterylizującą C, niż u mieszańców z CMS-P. (5) Zmapowanie dwóch pobocznych genów zaangażowanych w przywracanie męskiej płodności w mieszańcach żyta z cytoplazmą C na chromosomach 2R i 5R z wykorzystaniem populacji mapującej pozbawionej głównego genu restorerowego *Rfc1* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 4R. (6) Identyfikacja markera COS (c892) wykazującego sprzężenie z genem zlokalizowanym na chromosomie 2R, którego efektywność restorerową oszacowano jako znacząco większą niż genu z chromosomu 5R.

Uzyskane wyniki reprezentują wysoki poziom naukowy, przedstawiają dużą wartość poznawczą i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań m.in. analizy funkcjonalnej zidentyfikowanych genów. Jednocześnie należy podkreślić, że zarówno uzyskane w pracy



materiały, jak i opracowane markery będą mogły być wykorzystane w dalszych pracach nad żytem (markery COS) lub w selekcji w pracach hodowlanych (c892). Nie tylko wartość merytoryczna i poznawcza, ale również aplikacyjna pracy jest bardzo wysoka.

Z obowiązku recenzenta odnotowałam kilka uwag dotyczących rozprawy doktorskiej:

1. W mojej ocenie w „Przeglądzie literatury” brakuje omówienia rodzaju *Secale*, szczególnie, że Autorka wspomina o możliwości identyfikacji cytoplazm sterylizujących w mieszańcach międzygatunkowych. W tekście pojawiają się wzmianki o formach jednorocznych i wieloletnich, o diploidalnych i tetraploidalnych, o gatunkach, które prawdopodobnie uczestniczyły w formowaniu *Secale cereale*, tj. *S. vavilovii*, *S. anatolicum* i *S. montanum*. Podawanie tego typu informacji narzuca pytanie o kompozycję rodzaju *Secale* i chociaż podstawową systematykę. Tytuł podrozdziału pierwszego „Przeglądu literatury” wskazuje, że informacje na ten temat zawarto w tym rozdziale, jednak według mnie są one niewystarczające.
2. Wydaje mi się również, że w trzecim podrozdziale „Przeglądu literatury” dotyczącym cytoplazmatycznej męskiej sterility dobrze byłoby zamieścić informacje o męskiej sterility w ogóle, czyli o komponencie jądrowej i pozajądrowej. Poza tym brakuje w tym miejscu informacji, który z genomów organellarnych kontroluje męską sterility. W całym „Przeglądzie literatury” pojawia się tylko jedno zdanie, które łatwo przeoczyć: CMS jest efektem zaburzenia interakcji pomiędzy genami jądrowymi a mitochondrialnymi.
3. W „Przeglądzie literatury” nie znalazłam dokładnego opisu sposobu rozmnażania form z cytoplazmą sterylizującą, jak również wyjaśnienia czym są linie dopełniające i restorerowe, w jaki sposób otrzymuje się odmiany mieszańcowe czy też jaki jest skład takiej odmiany. Nie zauważyłam też wyjaśnienia dlaczego odmiany mieszańcowe są lepsze od populacyjnych, jaki jest ich udział w zasiewach, czym ich uprawa różni się od uprawy odmian populacyjnych itd. Prawdopodobnie dla osób zajmujących się żytem te informacje są oczywiste, stąd różne specjalistyczne pojęcia używane są bez wcześniejszego wyjaśnienia. Poruszane w pracy zagadnienia są jednak na tyle skomplikowane, że warto byłoby je omówić bardziej szczegółowo.
4. W podrozdziale 2.7 rozdziału „Materiały i metody” na rys. 7 przedstawiono elektroforegramy uzyskane w wyniku rozdziału produktów markerów SCAR *cox1*, *nad6* i *nad2*. Na rysunku, ani w tekście, nie podano jakiej wielkości produktów należy się spodziewać w przypadku różnych typów cytoplazm. Trudno jest w związku z tym interpretować w kolejnym rozdziale wyniki uzyskane z udziałem tych markerów.
5. Jeśli chodzi o metodykę mam również zastrzeżenia do zastosowanego w reakcjach PCR stężenia dNTP. Standardowo do reakcji o podanej objętości powinny zostać dodane 4 mM dNTP, a w tym przypadku dodawano aż 12mM nukleotydów (Tab. 1 i 3). W związku z tym w niektórych reakcjach niezbędne było podwyższenie stężenia $MgCl_2$ w celu uzyskania produktów amplifikacji, gdyż dNTPy łącząc się z jonami Mg^{2+} czyniły



- je niedostępnymi dla polimerazy. Jestem również zwolenniczką podawania w metodyce stężeń końcowych odczynników wykorzystywanych w reakcji PCR, a nie ich objętości.
6. W rozdziale prezentującym wyniki za błąd uważam brak opisu zdjęć elektroforegramów, a więc brak podpisów poszczególnych ścieżek, przypisania fenotypów oraz wielkości amplifikowanych produktów, gdyż na zdjęciach widoczne są produkty o różnej intensywności i/albo wielkości. Bardzo ciężko jest zinterpretować wyniki nawet jeśli te same zdjęcia zapisane są w postaci tabel. Autorka nie komentuje również przyczyn powstawania dwóch produktów w próbce nie odpowiadających produktom stwierdzonym u form rodzicielskich (Ryc. 16).
 7. W rozprawie nie udało się uniknąć błędów stylistycznych. Użyto sformułowań, które w moim mniemaniu można by zredagować inaczej takich jak: „izolaty DNA”, „wykazujące bliską korelację”, „zaobserwowano 38% wypadów”, „u jednego badanego pojedyńka”, „może mieć jakiś ewolucyjny wpływ”. Pojawiło się kilka zdań, które są niefortunnym skrótem myślowym np. „dominującą pozycję w strukturze zasiewów żyta zaczyna zajmować cytoplazma Pampa”, „geny zlokalizowane w cytoplazmie”, „(...) zostały wysiane do multidonic, z których pobrano młode liście”, „na populacji mapującej (...) przeprowadzono analizy molekularne”. Ponadto w stosunku do tych samych odmian stosowane są wymiennie określenia „europejskie odmiany populacyjne żyta ozimego” oraz „europejskie populacje żyta ozimego”. Czy rzeczywiście są one równoważne?

Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi są mało znaczące i nie wpływają na moją wysoce pozytywną opinię na temat rozprawy i nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, mogą być jednak wykorzystane przed opublikowaniem wyników w czasopismach naukowych.

W trakcie obrony chciałabym usłyszeć od Doktorantki odpowiedzi na pytania, które sformułowałam w trakcie lektury recenzowanej pracy:

1. Co łączy geny *Rfp* oraz *Rfc* i czy postulowano jakie białka są kodowane przez te geny? A także, jakie białka kodowane są przez geny mitochondrialne odpowiedzialne za warunkowanie cytoplazmatycznej męskiej sterility?
2. Proszę o skomentowanie stwierdzeń zawartych w pracy: (1) Metoda DArTseq oferuje również relatywnie lepsze pokrycie genomu z wysoką powtarzalnością i generuje markery z mniejszą ilością brakujących danych w porównaniu z innymi metodami GBS. (2) Pierwszy rodzaj pozyskiwanych danych markerowych (SilicoDArT) jest bardziej liczny, natomiast drugi (SNP) jest bardziej informatywny. Z kontekstu wynika, że to drugie zdanie odnosi się ogólnie do technologii DArTseq, a powinno jednak komentować wyniki uzyskiwane tą technologią w przypadku żyta. Zaznaczę tylko, że w przypadku innych zbóż sytuacja jest odwrotna.
3. Czy podjęto próbę konwersji do warunków specyficznego PCR markerów DArTseq sprzężonych z fenotypową oceną męskiej płodności? Jeśli nie, to jakie techniki można byłoby wykorzystać aby dostarczyć hodowcom/naukowcom łatwe do zastosowania narzędzie selekcyjne?



Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską Pani mgr inż. Martyny Sobczyk oceniam bardzo pozytywnie. Uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę jest bardzo aktualny, a cele badawcze sformułowane w sposób jasny i prawidłowy. Dzięki zastosowaniu właściwych metod wytyczone cele zostały w pełni zrealizowane, postawione hipotezy badawcze zweryfikowane, a uzyskane wyniki i wnioski znajdują pełne potwierdzenie w materiale dokumentacyjnym przedstawionym w tabelach i na rysunkach. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki mają znaczenie aplikacyjne i mogą w przyszłości wspomóc hodowlę nowych mieszańcowych odmian żyta w oparciu o system CMS-C. Mogą również przyczynić się do zwiększenia różnicowania odmian tego gatunku pod względem genomów organellarnych, a być może umożliwić uzyskanie materiałów o lepszych parametrach użytkowych, w tym większej plenności czy odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne.

WNIOSEK KOŃCOWY

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Martyny Sobczyk pt. „Występowanie genów męskiej sterility w wybranych populacjach żyta ozimego oraz poszukiwanie markerów molekularnych sprzężonych z pobocznymi genami przywracającymi płodność w systemie CMS-C” spełnia kryteria określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789), uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261), zgodnie z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). Dysertacja Pani mgr inż. Martyny Sobczyk stanowi oryginalne, kompleksowe rozwiązanie problemu naukowego poszerzające aktualny stan wiedzy, prezentuje ogólną wiedzę Kandydatki w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Rolnictwo i Ogrodnictwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Martyny Sobczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, uznając bardzo wysoką wartość naukową i aplikacyjną recenzowanej rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.



Lublin, dnia 31 sierpnia 2023 roku

