



**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE
NATIONAL RESEARCH INSTITUTE**

tel. centrala: +(4822)7334500, e-mail: postbox@ihar.edu.pl
<http://www.ihar.edu.pl>, REGON 000079480, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008
Nr konta: PEKAO I/O Błonie, 54 1240 2164 1111 0000 3561 7204

Dr hab. Michał Kwiatek
Zastępca Dyrektora ds. naukowych
e-mail: m.kwiatek@ihar.edu.pl
tel. +(48 22) 725 45 03

Radzików, dnia 16 sierpnia 2023 r.

Recenzja pracy doktorskiej **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”

Praca doktorska, której dotyczy niniejsza recenzja, została wykonana w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Promotorem pracy jest Pan dr hab. inż. Stefan Stojałowski, prof. ZUT. Recenzję pracy wykonano na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo ZUT z dnia 30 czerwca 2023 r., zawierającej informację o powołaniu mojej osoby na recenzenta rozprawy doktorskiej. Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma charakter monografii naukowej, co dopuszcza artykuł art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) i 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).

Zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterility to narzędzie do efektywnej produkcji nasion mieszańcowych, które w odniesieniu do odmian konwencjonalnych, charakteryzują się znacznie wyższym plonem. Odmiany mieszańcowe posiadają zalety charakterystyczne dla efektu heterozji, ale również można doszukać się w tym przypadku wad, takich jak kontrola firm hodowlanych nad materiałem siewnym i zagrożenie dla bioróżnorodności poprzez zawężanie genetyczne. Niniejsza praca wpisuje się w nurt badań nad alternatywami dla systemu CMS-P, które mogą przyczynić się do poszerzenia zmienności genetycznej form mieszańcowych żyta oraz pozwolić formom mieszańcowym, opartych na innych systemach CMS konkurować na rynku z odmianami bazującymi na cytoplazmie typu „Pampa”. Do takich alternatywnych systemów wykorzystujących cytoplazmatyczno-genową męską sterility u żyta jest cytoplazma C odkryta przez prof. Łapińskiego, na Akademii Rolniczej w Szczecinie (obecnie Zachodniopomorski Uniwersytet

Technologiczny). Badania promotora pracy doktorskiej, prof. Stefana Stojalowskiego nad tym systemem wykazały, że główny gen jądrowy przywracający płodność w cytoplazmie C jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4R. Oceniana praca doktorska Pani mgr inż. Martyny Sobczyk jest kontynuacją tego programu badawczego i wychodzi naprzeciw kwestii poznania genów dodatkowych (pobocznych), które u żyta z cytoplazmą CMS-C mają także istotny wpływ na ekspresję omawianej cechy.

Praca doktorska Pan mgr inż. Martyny Sobczyk zawiera 122 stron i jest uporządkowana według powszechnie stosowanego układu w tego typu opracowaniach. Rozprawa składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Hipoteza badawcza, Przegląd literatury z podrozdziałami, Materiał i metody z podrozdziałami, Wyniki z podrozdziałami, Dyskusja podzielona na podrozdziały, Podsumowania i wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Załączniki (protokoły, spisy markerów) oraz Spisy rycin, tabel, literatury.

Rozdział zatytułowany „Wstęp” wprowadza czytelnika w zakres tematyki podjętej w pracy doktorskiej. W nim, w sposób syntetyczny i jasny opisano zagadnienia, które są celem dysertacji. Następnie, w rozdziale Hipoteza badawcza, Autorka przedstawiła główne założenie swojej pracy doktorskiej, mówiące o tym, iż w genomie żyta ozimego z cytoplazmą sterylizującą C, oprócz głównego genu przywracającego męską płodność na chromosomie 4R, występuje jeden lub więcej pobocznych genów restorerowych. W dalszej kolejności, co uważam za bardzo dobre, Autorka przedstawia cele pracy oraz sposoby testowania swojej hipotezy a także korzyści płynące z jej badań dla hodowli.

W kolejnym rozdziale dotyczącym przeglądu piśmiennictwa, Pani mgr Martyna Sobczyk omówiła filogenezę żyta a także cechy morfologiczne i fizjologiczne tego gatunku, znaczenie gospodarcze tego zboża a następnie przedstawiła przegląd literatury dotyczący głównego aspektu pracy, tj. cytoplazmatycznej męskiej sterylności u żyta w ujęciu genetyczno-hodowlanym. Szeroko a zarazem syntetycznie i przejrzysto opisała systemy CMS charakterystyczne dla żyta z uwzględnieniem tych, wykorzystywanych w hodowli, charakteryzując przy tym podstawy genetyczne i fizjologiczne tych systemów oraz wskazując ich wady i zalety. Wg mojej oceny olbrzymią wartość poznawczą ma podrozdział dotyczący hodowli odmian mieszańcowych żyta ozimego, gdzie Autorka zaprezentowała przekrój i historię prac badawczych nad tym zagadnieniem w odniesieniu do najnowszych wyników badań oraz aktualnej sytuacji ekonomiczno-prawnej rynku hodowlano-nasiennego. W ostatnim podrozdziale Autorka opisała techniki molekularne

wykorzystywane do poszukiwania loci i regionów genomu warunkujących ważne cechy z perspektywy hodowli żyta ozimego, a w szczególności opisała rodzaje markerów molekularnych wykorzystanych na potrzeby zweryfikowania hipotezy badawczej swojej pracy. Podsumowując, wysoko oceniam przegląd literatury tematu zawarty w niniejszej pracy doktorskiej. Po lekturze tego rozdziału stwierdzam, że Autorka posiada rozległą wiedzę genetyczno-hodowlaną. Imponuje zakres pozycji literaturowych, wykorzystany do opisu zagadnień poruszonych w pracy.

W rozdziale „Materiały i metody” Pani mgr inż. Martyna Sobczyk scharakteryzowała materiały oraz metody badawcze wykorzystane w trakcie prowadzonych badań. Imponujący jest zakres i stopień zaawansowania materiałów hodowlanych użytych w pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania unikatowych materiałów w postaci zróżnicowanych pod względem męskiej płodności linii wsobnych żyta ozimego posiadających cytoplazmę typu P i C, wychodowanych w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie przez profesora Mirosława Łapińskiego, których hodowla była kontynuowana przez promotora niniejszej pracy, prof. Stefana Stojalowskiego, co znalazło także kontynuację w ramach badań będących przedmiotem tej pracy doktorskiej. Za godny podkreślenia uważam opis prac polowych wykonanych na cele otrzymania mieszańców z odmianami populacyjnymi oraz utworzenia populacji mapującej. Warto podkreślić, iż prace nad wytworzeniem tego zestawu konkretnych genotypów i form wymagały wysokich kwalifikacji, umiejętności, oraz olbrzymich nakładów czasu pracy wielu ludzi. Uważam, że obecnie, w dobie badań prowadzonych głównie na roślinach lub odmianach modelowych, należy podkreślać wagę i celowość badań z użyciem materiałów wyprowadzonych w ramach konkretnego celu badawczego, który oprócz aspektów poznawczych charakteryzuje się także walorami aplikacyjnymi i cechami wdrożeniowymi. Oprócz materiałów własnych, w badaniach zastosowano także odmiany populacyjne żyta ozimego (Dańkowskie Diament, Bosmo, Amilo, Stanko, Vjatka, Hungarian Giant, Landsorte K9538, Svalofs St 52404, St. Wageningen), które wykorzystano w celu przeprowadzenia analiz molekularnych dotyczących identyfikacji analizowanych typów cytoplazm. W dalszej części rozdziału Doktorantka opisała dwie metody oceny płodności opierające się na obserwacji kwitnących kłosów i wzrokowej ocenie efektywności ich pylenia oraz na efektywności zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach. W kolejnych podrozdziałach oraz załącznikach czytelnik otrzymuje kompletną i przejrzystą informację na temat metod i technik molekularnych zastosowanych w pracy ze szczegółowym opisem zastosowanych procedur i protokołów. Do identyfikacji typu cytoplazmy w badanym materiale roślinnym Autorka zastosowała markery typu SCAR, natomiast do poszukiwań genów restorerowych zastosowała markery COS oraz DArT, do analizy których wykorzystwała szeroki wachlarz metod statystycznych i bioinformatycznych. Opisane w tym rozdziale procedury

umożliwiły realizację postawionych celów i nie budzą zastrzeżeń od strony metodycznej.

Wyniki badań opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej są wg mnie bardzo wartościowe i istotnie poszerzają wiedzę na temat występowania cytoplazm sterylizujących w europejskich populacjach żyta ozimego. Badania pozwoliły określić występowanie jądrowych alleli sterylności/płodności w europejskich populacjach żyta ozimego. Ponadto, rezultaty badań pozwoliły określić lokalizacje chromosomowe pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C. Bardzo wysoko oceniam sposób zaplanowania badań, które podzielono na następujące po sobie etapy w ujęciu przyczynowo skutkowym. Prace rozpoczęto od analiz typów cytoplazmy u czterech rodzimych odmiany populacyjnych oraz pięciu historycznych populacji żyta ozimego, przy użyciu markerów SCAR, w wyniku których Autorka wykazała, że w odmianach historycznych żyta ozimego nie występowała cytoplazma sterylizująca typu Pampa, za to stwierdzono u nich obecność dwóch rodzajów cytoplazm: normalnej i CMS-Vavilovii. Natomiast w rodzimych odmianach populacyjnych żyta ozimego, obserwowano te same dwa rodzaje cytoplazm, lecz w dwóch odmianach (Dańkowskie Diament i Stanko) oraz dodatkowo stwierdzono obecność cytoplazmy Pampa. Istotnym spostrzeżeniem jest fakt, iż w odmianie Dańkowskie Diament dominującą część populacji stanowiły rośliny z cytoplazmą CMS-P.

W dalszej części prac przeprowadzono unikalne krzyżowania testowe z udziałem linii męskosterylnych 541C (z cytoplazmą C) i 541P (z cytoplazmą Pampa) w celu oceny fenotypów uzyskanych mieszańców. Co istotne, w przypadku mieszańców z cytoplazmą sterylizującą C Autorka odnotowała skuteczniejsze przywracanie płodności w porównaniu do mieszańców z cytoplazmą CMS-P. Co więcej, w przypadku mieszańców z cytoplazmą Pampa, poszczególne populacje żyta wykazywały zróżnicowaną zdolność do przywracania męskiej płodności. Z aplikacyjnego punktu widzenia, dużą wagę mają wyniki dowodzące, że odmiany Dańkowskie Amber, Dańkowskie Diament i Armand były skuteczniejsze w przywracaniu męskiej płodności w porównaniu do odmiany Horyzo oraz populacji historycznych.

W kolejnym kroku mgr inż. Martyna Sobczyk podjęła trud identyfikacji genów pobocznych, zaangażowanych w przywracanie męskiej płodności w mieszańcach żyta z cytoplazmą typu C. W tym celu wykorzystwała populację mapującą [544C x Mot] BC1 oraz rośliny kolejnych pokoleń, które otrzymano poprzez krzyżowanie wsteczne i chów wsobny. Z populacji tej usunięto gen restorerowy *Rfc1* (4R) poprzez selekcję wspieraną markerami SCAR, zatem obserwowane częściowe pylenie roślin w kolejnych pokoleniach musiało być warunkowane jedynie przez poboczne geny restorerowe. Następnie Doktorantka przeprowadziła analizy populacji mapującej [544C x Mot]BC1, wykorzystując 271 markerów typu COS i 3 markery SCAR co zaowocowało identyfikacją

polimorficznego markera (c892) na chromosomie 2R, który wykazywał korelację z cechą płodności. Autorka wykonała także analizy populacji mieszańcowych [544C x Mot]BC3F3 i [544C x Mot]BC3F4 przy użyciu technologii DarTseq oraz testu nieparametrycznego Kruskala-Wallisa, które potwierdziły lokalizację pobocznego genu restorerowego na chromosomie 2R – 106 markerów oraz wskazały także chromosom 5R – 122 markery istotnie statystycznie związane z przywracaniem męskiej płodności, przy czym Doktorantka podaje, że efekt fenotypowy genu z chromosomu 2R jest znacząco większy w porównaniu do genu z chromosomu 5R. Do najważniejszych osiągnięć w tej części analiz zaliczam identyfikację 15 markerów zmapowanych na chromosomie 2R, które wykazały największą przydatność do selekcji genotypów dopełniających męską sterylność w systemie CMS-C. Dziewięć z tych piętnastu markerów to markery dominujące SilicoDArT, które ze względu na brak możliwości odróżnienia homozygot ojcowskich od heterozygot nie są przydatne do selekcjonowania form przywracających męską płodność. Natomiast pozostałe 6 markerów SNP może być przydatne do identyfikowania genotypów restorerowych. Przy czym, co warto podkreślić, Autorka wskazuje, że gen *Rfc2* z chromosomu 2R nie jest wystarczający do pełnego przywrócenia męskiej płodności, zatem dobre linie ojcowskie muszą posiadać zarówno gen główny - *Rfc1* i poboczny - *Rfc2*.

Rozprawę doktorską kończy dobrze skonstruowana, podzielona na trzy podrozdziały, obszerna dyskusja, w której mgr inż. Martyna Sobczyk porównała uzyskane wyniki badań własnych z dostępną w literaturze wiedzą i konkluzjami innych badaczy. Rozdział ten został przygotowany bardzo starannie. Zawiera on odniesienia do kolejnych etapów wykonanych prac badawczych. Bardzo cenne są informacje dotyczące historii ewolucji i dystrybucji cytotypów żyta ozimego na świecie. W dalszej części rozdziału Autorka zauważa, że w objętych badaniami odmianach populacyjnych, częstość występowania genotypów zdolnych do przywracania męskiej płodności w mieszańcach z cytoplazmą Pampa była wyraźnie większa niż to odnotowano dla odmian o charakterze historycznym, co może mieć związek z rosnącą popularnością cytoplazmy Pampa w polskich odmianach populacyjnych. W ostatniej części dyskusji Doktorantka podaje przykłady ortologii pomiędzy genami odpowiadającymi za przywrócenie płodności istotnych gospodarczo gatunków, które podobnie jak żyto są przedstawicielami plemienia *Triticeae* tj. pszenicy i jęczmienia. Wielowymiarowej dyskusji poddała także wyniki badań nad identyfikacją genów restorerowych w populacji mapującej, które zakończyły się sukcesem w postaci zlokalizowania pobocznego genu restorerowego *Rfc2* na chromosomie 2R. Istotna wydaje się być konkluzja, iż wyniki analiz dotyczące zaledwie jednej populacji mapującej nie mogą zostać uznane za uniwersalne dla wyjaśnienia genetycznego podłoża męskiej płodności/sterylności w systemie cytoplazmatycznej męskiej sterylności typu C, ale stanowią

one ważną podstawę, które kierunkują przyszłe badania, mające na celu poznanie tego zjawiska.

Podsumowaniem rozprawy jest 6 wniosków, które przedstawiono w rozdziale „Podsumowania i wnioski”. Konkluzje są sformułowane poprawnie i w mojej ocenie znajdują potwierdzenie w przedstawionej dokumentacji wyników oraz w dyskusji na bazie literatury tematu.

W trakcie analizy i recenzji niniejszej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne przemyślenia oraz pytania do Doktorantki, które przedstawiam poniżej:

1. W przeglądzie literatury opisano podstawowy model działania systemu CMS, gdzie wyróżnia się dwa rodzaje cytoplazm: niesterylizującą „N” (normalna) i sterylizującą „S”. Według tego modelu geny cytoplazmatyczne indukujące męską sterility współdziałają z parą genów jądrowych *Rf*. Dominujące allele genu *Rf* umożliwiają przywrócenie męskiej płodności u potomstwa zawierającego cytoplazmę sterylizującą „S”. Natomiast w hipotezie pracy, która następnie została udowodniona, wykazano, że istnieją geny poboczne, z czego jeden, zlokalizowany na chromosomie 2R wykazał istotny efekt fenotypowy. Czy mogłaby Pani zademonstrować model działania tego systemu CMS uwzględniający współdziałanie genu głównego wraz z genami pobocznymi?
2. Czy środowisko zewnętrzne (interakcja ze środowiskiem) ma wpływ na poziom ekspresji CMS-C?
3. Czy przewiduje Pani konwersję zidentyfikowanych markerów na markery PCR, które byłyby łatwe do wykorzystania przez laboratoria diagnostyczne firm hodowlanych?
4. Czy planowane jest zwiększenie liczby populacji mapujących oraz liczbę pojedynków w obrębie każdej populacji mapującej w celu wyjaśnienia genetycznego podłoża męskiej płodności/sterility w systemie cytoplazmatycznej męskiej sterility C (CMS-C)?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Martynty Sobczyk istotnie poszerza zakres wiedzy na temat systemów genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility u roślin. Z uznaniem pragnę podkreślić kompleksowe podejście Doktorantki do badanego zagadnienia oraz jej rozległą wiedzę i szeroki wachlarz umiejętności, który pozwolił na wielowymiarową analizę obranego problemu badawczego. Do kluczowych osiągnięć niniejszej pracy doktorskiej zaliczam:

1. Utworzenie subpopulacji mieszańcowej, która nie posiadała głównego genu restorerowego *Rfc*, wskutek jego usunięcia poprzez preselekcję komponentów rodzicielskich przy użyciu markerów SCAR. W konsekwencji, segregacje fenotypowe w kolejnych pokoleniach (rośliny

męskosterylne i męskopłodne) wynikały z działania pobocznych genów restorerowych, a uzyskany unikalny materiał roślinny mógł służyć jako populacja mapująca do identyfikacji tych genów.

2. Identyfikacja markera COS (c892) na chromosomie 2R, korelującego z cechą męskiej płodności.
3. Lokalizacja nieznanymi wcześniej genów biorących udział w procesie przywracania męskiej płodności żyta z cytoplazmą C. Te geny miały charakter poboczny, o stosunkowo niewielkim wpływie fenotypowym i zostały zmapowane na chromosomach 2R oraz 5R.

Uważam, że podjęty temat badawczy jest bardzo aktualny i wpisuje się w aktualny nurt badań związanych z poznaniem podstaw genetyczno-fizjologicznych systemów genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility oraz poszukiwaniem alternatyw dla systemu CMS-Pampa w hodowli żyta. Poprzez zastosowanie unikalnego materiału roślinnego, wytworzonego na cele rozwiązania podjętego tematu badawczego, a także dzięki użyciu właściwych, nowoczesnych i zróżnicowanych metod badawczych, cele niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane a wyniki i wnioski potwierdzają postawioną hipotezę badawczą.

Praca doktorska mgr inż. Martynty 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 wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Ze względu na wagę uzyskanych wyników, w szczególności zlokalizowanie nieznanymi wcześniej genów biorących udział w procesie przywracania męskiej płodności żyta z cytoplazmą C oraz znaczenie podjętego tematu badawczego dla hodowli tego gatunku stawiam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Radzików, dnia 16 sierpnia 2023 roku.

