

ABSTRACT

Winter rye, despite the fact that it is of relatively small importance on a global scale, is one of the basic cereals in Polish agricultural production. The economic importance of rye in Poland is strongly related to its frost resistance and low soil requirements. It is primarily a fodder grain, but it also finds many other applications, e.g. in the grain milling industry, in the production of green mass or as a source of renewable energy. From the mid-80s of the 20th century, rye hybrid varieties began to be registered, which are characterized by better uniformity and significantly higher yield potential. Seed production of hybrid varieties of rye applies the phenomenon of cytoplasmic male sterility (CMS), which makes it possible to obtain sterile plants without manual castration. In winter rye, we distinguish two types of sterilizing cytoplasm: Pampa (CMS-P) i Vavilov (CMS-V). The cytoplasm of Vavilov includes sources of cytoplasmic male sterility such as: CMS-C, CMS-R, CMS-S and CMS-G, which are generally considered genetically identical. Almost all registered hybrid varieties of cultivated rye (*Secale cereale* L.) are based on CMS-P. The Pampa cytoplasm reveals a strong sterilizing effect, and thus it is difficult for breeders to effectively restore male fertility in hybrid varieties. Therefore, it would be worth introducing more varieties with an alternative type of sterilizing cytoplasm into cultivation - CMS-V. Wider use of the Vavilov cytoplasm would result in an increase in genetic diversity within hybrid varieties of rye, and at the same time, in the obtained hybrids, restoring male fertility should not be a problem. The intensification of breeding work on hybrid varieties based on the CMS-V system will be supported by a more accurate understanding of the genetic mechanisms responsible for fertility/sterility control.

In this paper, research was undertaken with the aim of: extending the knowledge on the occurrence of sterilizing cytoplasm in European populations of winter rye, assessing the frequency of nuclear sterility/fertility alleles in European populations of winter rye, and determining the chromosomal location of minor nuclear genes controlling the restoration of male fertility in the C cytoplasm.

As part of expanding knowledge about the occurrence of different types of cytoplasm in rye populations, four Polish population varieties and five European historical populations were tested using SCAR molecular markers (seeds of varieties not cultivated for several decades were obtained from gene banks). The results showed the absence of Pampa-type sterilizing cytoplasm in European historical winter rye varieties - only plants with Normal and CMS-Vavilov cytoplasm appeared in them. In Polish population varieties, the same two

types of cytoplasm occurred, but in two varieties (Dańkowskie Diament and Stanko) the presence of Pampa cytoplasm was additionally found. In the Dańkowskie Diament cultivar, plants with CMS-P constituted the dominant part of the population (only one of the tested plants had cytoplasm other than Pampa).

In order to estimate the frequency of nuclear sterility/fertility alleles in European populations of winter rye, test crosses were carried out with male sterile lines 541C (with C cytoplasm) and 541P (with Pampa cytoplasm), followed by visual phenotypic evaluation of the resulting hybrids. In total 2419 hybrid plants with Polish populations and European historical populations of winter rye as pollinators were assessed. Hybrids with sterilizing C cytoplasm generally showed more effective fertility restoration than hybrids with CMS-P. The individual rye populations studied differed more or less significantly in terms of their ability to restore male fertility. This was particularly noticeable in hybrids with the Pampa cytoplasm: the cultivars Dańkowskie Amber and Dańkowskie Diament, and to a slightly lesser extent Armand, were more effective in restoring male fertility than the Horyzo cultivar and the historical populations.

The mapping of minor genes involved in the restoration of male fertility in rye hybrids with cytoplasm C, was performed using the mapping population [544C x MOt]BC1 and its subsequent generations obtained by backcrossing, and then (from the BC3 generation) also inbreeding (F2-F5 generations). Pre-selection of paternal components used for hybridization, which was performed with the use of SCAR molecular markers, resulted in the fact that the examined generations of the mapping population did not contain the main restorer gene *Rfc1* located on the long arm of the 4R chromosome. Thanks to this, the pollination in some of plants observed in each subsequent segregating generation resulted from the presence of secondary restorer genes, allowing the use of produced plant material as a mapping population to determine the location of these genes. In the first stage of the study, molecular analyzes of the [544C x MOt]BC1 mapping population were carried out using 274 PCR-based markers (271 COS markers and 3 SCAR). As a result of these analyses, one polymorphic marker (c892) was identified on chromosome 2R, showing a correlation with the fertility restoration. Next, analyzes of the [544C x MOt]BC3F3 and [544C x MOt]BC3F4 hybrid populations were performed using the DArTseq technology and the non-parametric Kruskal-Wallis test, and the results indicated chromosome 2R and 5R as the locations of minor restorer genes. The phenotypic effect of a gene located on chromosome 2R appears to be significantly greater than that of a gene located on chromosome 5R.

Keywords: rye, cytoplasmic male sterility, CMS-C, minor restorer genes, COS markers, DArTseq

28.05.2023
17. 5. 2023

STRESZCZENIE

Żyto ozime, mimo iż w skali światowej ma stosunkowo niewielkie znaczenie, to stanowi jedno z podstawowych zbóż w polskiej produkcji rolniczej. Znaczenie gospodarcze żyta w Polsce silnie wiąże się z jego mrozoodpornością i niewielkimi wymaganiami glebowymi. Jest ono przede wszystkim zbożem paszowym, ale znajduje również wiele innych zastosowań m.in. w przemyśle zbożowo-młynarskim, w produkcji zielonej masy czy też, jako źródło odnawialnej energii. Od połowy lat 80-tych XX wieku zaczęto rejestrować odmiany mieszańcowe żyta, które charakteryzują się lepszym wyrównaniem i wyraźnie większym potencjałem plonotwórczym. Produkcja nasienna odmian mieszańcowych żyta wykorzystuje zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS), dzięki któremu możliwe jest otrzymanie roślin sterylnych bez ręcznego kastrowania. U żyta ozimego wyróżniamy dwa typy cytoplazm sterylizujących: Pampa (CMS-P) i Vavilovii (CMS-V). Do cytoplazmy Vavilovii zaliczamy źródła cytoplazmatycznej męskiej sterility takie jak: CMS-C, CMS-R, CMS-S i CMS-G, które powszechnie uznaje się za genetycznie tożsame. Prawie wszystkie zarejestrowane odmiany mieszańcowe żyta uprawnego (*Secale cereale* L.) oparte są na CMS-P. Cytoplazma Pampa wykazuje silne działanie sterylizujące, a co za tym idzie nastręcza hodowcom trudności przy skutecznym przywracaniu męskiej płodności w odmianach mieszańcowych. Dlatego też warto byłoby wprowadzić do uprawy większą liczbę odmian z alternatywnym typem cytoplazmy sterylizującej - CMS-V. Szersze wykorzystanie cytoplazmy Vavilovii spowodowałoby zwiększenie różnicowania genetycznego w obrębie odmian mieszańcowych żyta, a jednocześnie w uzyskiwanych mieszańcach przywrócenie męskiej płodności nie powinno stanowić trudności. Intensyfikacji prac hodowlanych nad odmianami mieszańcowymi opartymi o system CMS-V sprzyjać będzie dokładniejsze poznanie genetycznych mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę płodności/sterility.

W niniejszej pracy podjęto badania zmierzające do: poszerzenia wiedzy na temat występowania cytoplazm sterylizujących w europejskich populacjach żyta ozimego, oceny frekwencji jądrowych alleli sterility/płodności w europejskich populacjach żyta ozimego oraz określenia chromosomowej lokalizacji pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C.

W ramach poszerzenia wiedzy o występowaniu różnych typów cytoplazm w populacjach żyta, za pomocą markerów molekularnych SCAR przebadano cztery polskie odmiany populacyjne i pięć europejskich populacji historycznych (nasiona nieuprawianych od kilkudziesięciu lat odmian otrzymano z banków genów). Wyniki wykazały brak obecności

cytoplazmy sterylizującej typu Pampa w europejskich odmianach historycznych żyta ozimego – pojawiały się w nich wyłącznie rośliny z cytoplazmami Normalną i CMS-Vavilovii. W polskich odmianach populacyjnych występowały te same dwa rodzaje cytoplazm, ale w dwóch odmianach (Dańkowskie Diament i Stanko) stwierdzono dodatkowo obecność cytoplazmy Pampa. W odmianie Dańkowskie Diament rośliny z CMS-P stanowiły dominującą część populacji (tylko jedna z badanych roślin miała cytoplazmę inną niż Pampa).

W celu oszacowania frekwencji jądrowych alleli sterility/płodności w europejskich populacjach żyta ozimego przeprowadzono krzyżowania testowe z udziałem męskosterylnych linii 541C (z cytoplazmą C) i 541P (z cytoplazmą Pampa), a następnie wzrokową ocenę fenotypową uzyskanych mieszańców. Ocenie poddano 2419 roślin mieszańcowych z polskimi odmianami oraz z europejskimi populacjami historycznymi żyta ozimego w roli zapylaczy. U mieszańców z cytoplazmą sterylizującą C generalnie obserwowano efektywniejsze przywracanie płodności niż u mieszańców z CMS-P. Poszczególne badane populacje żyta różniły się mniej lub bardziej znacznie pod względem zdolności do przywracania męskiej płodności. Szczególnie wyraźnie dawało się to zauważyć w przypadku mieszańców z cytoplazmą Pampa: odmiany Dańkowskie Amber i Dańkowskie Diament oraz w nieco mniejszym stopniu Armand były efektywniejsze w przywracaniu męskiej płodności niż odmiana Horyzo oraz populacje historyczne.

Mapowanie pobocznych genów zaangażowanych w przywracanie męskiej płodności w mieszańcach żyta z cytoplazmą C wykonano wykorzystując populację mapującą [544C x MOt]BC1 oraz jej kolejne generacje otrzymywane na drodze krzyżowania wstecznego, a następnie (od pokolenia BC3) również chowu wsobnego (pokolenia F2-F5). Preselekcja komponentów ojcowskich użytych do krzyżowania, którą wykonano z użyciem markerów molekularnych SCAR spowodowała, że badane pokolenia populacji mapującej nie posiadały głównego genu restorerowego *Rfc1* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 4R. Dzięki temu pylenie części roślin obserwowane w każdym kolejnym segregującym pokoleniu wynikało z obecności pobocznych genów restorerowych pozwalając na użycie wytworzonego materiału roślinnego, jako populacji mapującej do określenia lokalizacji tych genów. W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizy molekularne populacji mapującej [544C x MOt]BC1 z wykorzystaniem 274 markerów opartych o metodę PCR (271 markerów typu COS i 3 SCAR). W wyniku tych analiz na chromosomie 2R zidentyfikowano jeden polimorficzny marker (c892) wykazujący korelację z cechą płodności. Następnie przeprowadzono analizy populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 wykorzystując technologię DArTseq oraz nieparametryczny test Kruskala-

Wallisa i uzyskano wyniki wskazujące na chromosomy 2R oraz 5R, jako lokalizacje pobocznych genów restorerowych. Efekt fenotypowy działania genu zlokalizowanego na chromosomie 2R wydaje się być znacząco większy niż genu z chromosomu 5R.

Słowa kluczowe: żyto, cytoplazmatyczna męska sterility, CMS- C, poboczne geny restorerowe, markery COS, DArTseq

29.05.2023 r.

W. Szymański

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 sterylności 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 sterylności 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 kilkudziesięciu 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 przezwycięzania 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 przemyśłany sposób. 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. Martyny 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 zreagować inaczej takich jak: „izolaty DNA”, „wykazujące bliską korelację”, „zaobserwowano 38% wypadów”, „u jednego badanego pojedynka”, „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





**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 Stojałowskiego, 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 odmian 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 Diamant i Stanko) oraz dodatkowo stwierdzono obecność cytoplazmy Pampa. Istotnym spostrzeżeniem jest fakt, iż w odmianie Dańkowskie Diamant 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 Diamant 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. Martyny 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 nieznanych 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. 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 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 nieznanych 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.



UCHWAŁA NR 19
Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 15 grudnia 2023 r.

w sprawie nadania mgr inż. Martynie Sobczyk
stopnia doktora

Na podstawie § 17b ust. 1 pkt 2 Statutu ZUT (uchwała nr 75 Senatu ZUT z dnia 28 czerwca 2019 r., z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 2 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.), z art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.) oraz z § 16 ust. 3 i 19 uchwały nr 130 Senatu ZUT z dnia 29 maja 2023 r. (z późn. zm.) w sprawie określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora przez Rady Dyscyplin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie uchwala się, co następuje:

§ 1.

Rada Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr inż. Martynie Sobczyk stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Rady Dyscypliny
Rolnictwo i Ogrodnictwo



dr hab. inż. Paweł Milczarski, prof. ZUT

UCHWAŁA NR 20
Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 15 grudnia 2023 r.

w sprawie wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Sobczyk

Na podstawie § 17b ust. 1 pkt 2 Statutu ZUT (uchwała nr 75 Senatu ZUT z dnia 28 czerwca 2019 r., z późn. zm.) w związku z art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. poz. 1669, z późn. zm.), z § 3 pkt 4 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 21 maja 2019 r. w sprawie kryteriów i trybu przyznawania nagród Prezesa Rady Ministrów oraz wzoru wniosku o ich przyznanie (tekst jedn. Dz. U. z 2023 r. poz. 368) oraz z § 14 uchwały nr 130 Senatu ZUT z dnia 29 maja 2023 r. (z późn. zm.) w sprawie określenia sposobu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora przez Rady Dyscyplin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie uchwala się, co następuje:

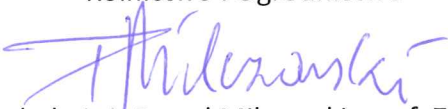
§ 1.

Rada Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wyróżnia rozprawę doktorską mgr inż. Martyny Sobczyk, pt. „Występowanie genów męskiej sterylności w wybranych populacjach żyta ozimego oraz poszukiwanie markerów molekularnych sprzężonych z pobocznymi genami przywracającymi płodność w systemie CMS-C”.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Rady Dyscypliny
Rolnictwo i Ogrodnictwo


dr hab. inż. Paweł Milczarski, prof. ZUT