

Wrocław, 10.06.2022

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni
Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Moniki Żurek pt.:

„Interakcja genów jądrowych linii wsobnych kukurydzy (*Zea mays* L.) z cytoplazmami indukującymi męską sterylność”

Rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Adamczyka reprezentującego Hodowlę Roślin Smolice Sp. z o. o., Grupa IHAR oraz promotora pomocniczego dr inż. Romana Warzechy z Zakładu Biologii Stosowanej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie.

Podstawa opracowania

Recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo RN-001-58/2022 z dnia 31 marca 2022 roku skierowane przez Dyrektora Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB w Radzikowie dr inż. Michała Rokickiego.

1. Ocena wyboru problematyki badawczej

Kukurydza należy do najistotniejszych roślin uprawnych na świecie obok pszenicy i ryżu. Również w Polsce daje się zaobserwować znaczny wzrost jej uprawy od roku 2012, sięgający ponad 1 mln ha i utrzymujący się przez kolejne lata. W Polsce hodowlą twórczą kukurydzy zajmują się dwa podmioty: Hodowla Roślin Smolice oraz Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Oddział Kobierzyce. Przedsiębiorstwo HR Smolice jest krajowym liderem nie tylko w hodowli, ale też produkcji odmian mieszańcowych kukurydzy. Odmiany tej firmy zajmują około 35% areалу uprawy tej rośliny w Polsce i są także uprawiane w krajach ościennych, między innymi w Czechach, Słowacji, Austrii, Niemczech i Francji. Polskie odmiany kukurydzy są dobrze zaadaptowane do warunków uprawy w różnych rejonach i środowiskach. Tolerują one gleby słabsze lub średnie. Postęp we współczesnej produkcji roślinnej związany jest z wykorzystaniem odmian heterozyjnych (mieszańcowych), które lepiej plonują niż linie rodzicielskie, są odporniejsze na choroby i niekorzystne oddziaływanie środowiska, i często

charakteryzują się wzmożoną syntezą pożądaných składników, np. sacharozy czy skrobi. Linie z cytoplazmatyczną męską sterylnością (CMS) różnych gatunków roślin są ważnymi komponentami odmian heterozyjnych, a ich wprowadzenie do prac hodowlanych było istotnym przełomem w rolnictwie. Niezdolność do wytwarzania funkcjonalnego pyłku eliminuje bowiem konieczność przeprowadzania pracochłonnej, ręcznej kastracji pylników oraz gwarantuje, że otrzymane nasiona są wynikiem przekrzyżowania, a nie samozapylenia. Linie CMS są obecnie znane dla około 150 gatunków roślin, stanowią cenny materiał użytkowy, jak również materiał do badań podstawowych zmierzających do poznania mechanizmów odpowiedzialnych za ekspresję cechy niepłodności pyłku. Linie mateczne męskosterylne powinny być stabilne w różnych środowiskach, a linie ojcowskie charakteryzować się posiadaniem efektywnych genów przywracania płodności pyłku (restoracji). Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska dotyczy zatem istotnego problemu u kukurydzy związanego z poznaniem interakcji genów jądrowych wybranych linii wsobnych kukurydzy z cytoplazmami cms-C i cms-T indukującymi męską sterylność u tego gatunku. Ponadto w pracy uwzględniono bardzo istotny aspekt również praktyczny, wpływu cytoplazmy męskosterylnej na plonowanie oraz cechy agronomiczne mieszańców F₁ kukurydzy.

2. Formalna analiza pracy

Przedłożona do oceny praca obejmuje 126 stron maszynopisu, w tym ponad 30 tabel, 6 Rysunków oraz 7 Fotografii. Praca składa się z 7 rozdziałów, które zostały uszeregowane w sposób logiczny i odpowiadający treści pracy. Rozdziały zamieszczono w następującej kolejności: 'Wstęp i cel pracy', 'Przegląd literatury', 'Materiał i metodyka badawcza', 'Wyniki', 'Dyskusja wyników', 'Wnioski', 'Spis literatury'. Autorka podzieliła główne rozdziały na podrozdziały, co nadaje rozprawie dużą przejrzystość, zwłaszcza w kontekście jej wielowątkowości. Między poszczególnymi rozdziałami zostały zachowane właściwe proporcje. Układ pracy został opracowany w sposób logiczny i odpowiada wymaganiam stawianym rozprawom doktorskim. Odbiór pracy niewątpliwie poszerza zamieszczony przez Autorkę Abstrakt w języku angielskim, w którym w skrótovej formie przedstawiła metodykę, cel i zakres badań oraz wyniki. Tytuł pracy „Interakcja genów jądrowych linii wsobnych kukurydzy (*Zea mays* L.) z cytoplazmami indukującymi męską sterylność” jest adekwatny do jej treści. Tematyka rozprawy jest aktualna, a problem badawczy ważny pod względem naukowym i praktycznym.

3. Merytoryczna analiza pracy

Zredagowany przez Autorkę 'Wstęp' bardzo dobrze odzwierciedla celowość podjętych badań. Doktorantka sformułowała również dwie hipotezy badawcze, które są właściwe merytorycznie i wskazują na przeprowadzenie przez Autorkę wnikliwej oceny stanu wiedzy dotyczącego roli i wpływu interakcji genów jądrowych i cytoplazmatycznych w kontekście hodowli twórczej i wdrażania postępu hodowlanego do praktyki rolniczej. W 'Przeglądzie literatury' na 30 stronach w oparciu o liczne publikacje, Autorka przedstawia stan wiedzy na temat męskiej sterylności u roślin, w tym u kukurydzy, z uwzględnieniem jej stabilności w zależności od warunków środowiska oraz wpływu cytoplazmy na cechy użytkowe odmian mieszańcowych. Sporo uwagi poświęca genetycznemu podłożu tej cechy oraz restoracji. Przegląd literatury kończy istotnymi aspektami dotyczącymi systematyki, hodowli i znaczenia gospodarczego kukurydzy. Rozdziały 'Wstęp' oraz 'Przegląd literatury' są bogato poparte cytatami, a ilość źródeł literaturowych, na które powołuje się Autorka świadczy o jej gotowości do prowadzenia prac badawczych i znajomości problematyki badawczej. W kilku miejscach, w tym we 'Wstępie' autorka używa sformułowania „W ostatnich latach, z uwagi na problematykę koegzystencji upraw kukurydzy genetycznie modyfikowanej i konwencjonalnej,” (str 12, 13), co powinno być jednak skorygowane, bo mamy do czynienia z terminem genetycznie zmodyfikowanych roślin, czy innych organizmów zgodnie z przyjętą terminologią w Ustawie o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych.

W mojej ocenie dobór cytowanych prac do poruszanych aspektów merytorycznych pracy jest właściwy. Autorka wykorzystwała najistotniejsze publikacje związane z tematem dysertacji, na które składają się głównie artykuły zamieszczone w fachowych czasopismach naukowych o zasięgu zarówno światowym jak i krajowym.

W rozdziale 'Materiał i metodyka badawcza' Doktorantka bardzo dokładnie i czytelnie opisała wykorzystany w pracy materiał badawczy oraz metody jego analizy, w zależności od zakresu podjętych badań. W badaniach nad interakcją linii wsobnych kukurydzy z cytoplazmami cms-C i cms-T posłużono się 37 liniami wsobnymi z Małopolskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o, 18 liniami wsobnymi z Hodowli Roślin Smolice Sp. z o. o, Grupa IHAR, 1 linią z zasobów Pracowni Kukurydzy i Pszenżyta IHAR-PIB oraz 1 historyczną linią pochodzącą z HR Smolice. Jako źródła cytoplazm sterylnych C i T wykorzystano linie Tc 208- cms C oraz Tc 208-cms-T. Interakcja między genami jądrowymi a cytoplazmą została określona na podstawie wizualnej oceny jakości oraz ilości pylników według skali opracowanej przez Kohls i in., (2011). W celu określenia wpływu cytoplazmy na plonowanie, cechy agronomiczne oraz skład

chemiczny ziarna pokolenia F_1 wykorzystano pokolenie uzyskane na drodze krzyżowania 3 form matecznych z cytoplazmą T oraz 3 analogicznych form z cytoplazmą normalną (N) z wybranymi sześcioma liniami wsobnymi o potwierdzonych właściwościach restorujących względem cytoplazmy T. W celu zaś zweryfikowania obecności genu $Rf4$ oraz/lub jego alleli $Rf4Rf4$, $Rf4rf4$ dla wybranych 20 linii wykorzystanych 6 markerów molekularnych blisko sprzężonych z analizowanym genem. Wybierając linie do analiz molekularnych Autorka kierowała się wynikami oceny interakcji z cytoplazmą C. Linie reprezentowały zróżnicowany poziom przywracania płodności lub dopełniały sterylność w tym typie cytoplazmy.

Dobór genotypów do realizacji zamierzonych celów jest kluczowy w tej dysertacji i świadczy o dużej znajomości Doktorantki materiałów hodowlanych i kolekcyjnych.

Doświadczenia realizowane w ramach poszczególnych etapów pracy wskazują na znaczną pracowitość zarówno podczas ich realizacji jak i gromadzenia danych empirycznych. Autorka wyczerpująco przedstawiła opis metod i procedur badawczych. Podjęty zakres analizowanych cech w kontekście celu pracy jest właściwy. Rozdział ten jest czytelny i dostarcza w większości wystarczającą ilość informacji, co do sposobu i zakresu prowadzonych badań. Jednak opis metod statystycznych (str. 57, 'Analiza statystyczna') do weryfikacji otrzymanych wyników został bardzo ogólnie i skromnie zredagowany. Autorka nie sprecyzowała przedstawiając zależności pomiędzy badanymi cechami w rozdziale 'Wyniki', czy posługiwała się analizą korelacji (np. dotyczy to relacji między ilością pylników i ich jakością - str. 63, 71 itd.)? Nie przedstawiono szczegółowiej zasad analiz wielowymiarowych, tutaj w dysertacji PCA, na których bazuje znaczna część opisowa wyników.

Opis wyników badań jest czytelny z konsekwentnym zachowaniem realizowanych etapów badań w układzie trzech głównych podrozdziałów, z wydzielonymi kolejnymi w ich obrębie podrozdziałami. W pierwszym z nich Autorka analizuje interakcję genów jądrowych linii wsobnych kukurydzy z cytoplazmami sterylizującymi. Na podstawie przeprowadzonej wizualnej oceny jakości oraz ilości pylników, w pokoleniu F_1 otrzymanym w wyniku krzyżowania cytoplazm sterylnych C i T z 57 liniami wsobnymi kukurydzy oraz w kolejnych pokoleniach (BC_1 , BC_2 , BC_3) otrzymanych w wyniku krzyżowań wstecznych, Autorka wyodrębniła sześć grupy linii wsobnych o zróżnicowanym efekcie przywracania płodności oraz linie dopełniające sterylność w zależności od cytoplazmy. Podczas czytania tego opisu wyników nasuwa się pytanie, jaki był wpływ roku na analizowane cechy związane z płodnością pyłku w puli badanych genotypów? Autorka w tabelach prezentuje wyniki z dwóch sezonów

wegetacyjnych. Istotnym elementem w tej części pracy jest zasygnalizowanie wpływu warunków pogodowych na analizowane cechy związane z płodnością pyłku.

Określenie wpływu cytoplazmy na cechy agrotechniczne i skład ziarna mieszańców zostało omówione w kolejnym podrozdziale. Autorka na początku tego rozdziału pisze: ‘Warunki pogodowe, panujące w latach 2016 i 2017 (tab. 4.1.1.1a i 4.1.1.1b) w Radzikowie wpłynęły istotnie jedynie na zmienność cech związanych ze zdrowotnością roślin (porażenie przez głownię, fuzariozę kolb, uszkodzenia przez omacnicę prosowiankę). Nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu warunków pogodowych na cechy agronomiczne, plonowanie oraz skład chemiczny ziarna. W związku z tym, w toku dalszych analiz uwzględniano lata doświadczenia jako czynniki zmienności jedynie w odniesieniu do zdrowotności roślin.’ Nasuwa się refleksja, dlaczego w tabelach umieszczono dane z poszczególnych lat, a nie same średnie z dwulecia, tam gdzie wpływ warunków pogodowych nie był istotny statystycznie? Czy został odnotowany wpływ roku badań na wyniki oceny jakości i ilości pylników oraz interwału między pyleniem wiech, a kwitnieniem znamion (ASI) w Radzikowie w latach 2016-2017? Autorka formułuje też między innymi takie stwierdzenie: ‘Analizując średnią wysokość roślin oraz średnią wysokość osadzenia kolby, nie stwierdzono znaczących różnic pomiędzy obiektami z cytoplazmą T, a obiektami z cytoplazmą normalną.’ Nasuwa się sugestia, czy nie warto podać wartości NIR w tabelach, aby jednoznacznie wskazać istotne różnice między średnimi dla genotypów pod względem analizowanych cech. Opis wyników byłby wtedy bardziej precyzyjny i nie trzeba by używać enigmatycznego sformułowania ‘...nie stwierdzono znaczących różnic...’. Powyższa uwaga odnosi się też do pozostałych omawianych cech.

W rozdziale ‘Dyskusja wyników’ Doktorantka porównała rezultaty swoich badań z wynikami innych autorów i nie tylko potwierdziła znane z literatury zależności, ale wyjaśniła je poprzez analizę wyników badań. O dojrzałości naukowej i znajomości potrzeb hodowli twórczej oraz nasiennictwa kukurydzy mieszańcowej świadczy interesująco sformułowane podsumowanie oraz wyciągnięcie prawidłowych wniosków.

Do najważniejszych osiągnięć w ocenianej dysertacji zaliczam:

- Rozpoznanie podłoża genetycznego pod względem występowania genów przywracających płodność cytoplazmom sterylnym C i T, co może się przyczynić na rozszerzenie wdrożenia systemu CGMS do produkcji nasiennej polskich odmian heterozyjnych kukurydzy.

- Zidentyfikowanie 35 linii całkowicie przywracających płodność pyłku w cytoplazmie C oraz 3 linii całkowicie przywracające płodność pyłku w cytoplazmie T oraz jednej linii przywracającej męską płodność w obydwóch typach cytoplazm - w stopniu całkowitym w cytoplazmie C oraz w stopniu częściowym w cytoplazmie T.

- Wykazanie przydatności oznaczania ilości i jakości pylników według skali zaproponowanej przez Kohls (2011) do oceny interakcji genów jądrowych linii wsobnych z cytoplazmami sterylnymi.

- Weryfikację hipotezy badawczej odnośnie faktu, że typ cytoplazmy wpływa na plonowanie, cechy agronomiczne oraz skład chemiczny ziarna pokolenia F_1 . Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na odrzucenie hipotezy badawczej w aspekcie wpływu typu cytoplazmy na plonowanie oraz cechy agronomiczne oraz na potwierdzenie jej w odniesieniu do wpływu typu cytoplazmy na zdrowotność roślin, masę tysiąca ziarniaków oraz zawartość białka w ziarnie.

- Udokumentowanie, że na obecnym etapie na podstawie obecności bądź braku dominujących alleli genu *Rf4* nie można jednoznacznie określić zdolności linii wsobnej do przywracania płodności w cytoplazmie C i wynikającą konieczność dalszych badań nad rozpoznaniem potencjalnych genów komplementarnych, a także genów inhibitorowych w stosunku do genów *Rf* oraz określenie stabilności działania genów *Rf* w zależności od warunków środowiska.

Ostatni rozdział 'Spis literatury' obejmuje 169 pozycji. Opracowania anglojęzyczne stanowią blisko 74% bibliografii. W pracy Autorka cytowała podręczniki, oryginalne prace twórcze oraz materiały konferencyjne. Dobór piśmiennictwa jest bardzo bogaty i związany z tematyką recenzowanej pracy. Jednak wykorzystując tak liczną literaturę Doktorantka nie ustrzegła się błędów natury edytorskiej. Spis literatury wymaga korekty, mianowicie należy ujednolicić nazwy czasopism i pisać je skrótowo lub stosując pełną nazwę.

4. Wniosek końcowy

Poddana ocenie rozprawa koncentruje się na istotnym zagadnieniu i stanowi interesujące wielowątkowe studium badawcze. Charakteryzuje się zarówno elementami poznawczymi jak i o wymiarze aplikacyjnym. Autorka dowiodła roli interakcji genów jądrowych wybranych linii wsobnych kukurydzy z cytoplazmami cms-C i cms-T, indukującymi męską sterylność w kukurydzy oraz określiła wpływ cytoplazmy męskosterylnej na plonowanie, cechy

agronomiczne oraz skład chemiczny ziarna mieszańców F_1 kukurydzy. Wykazała się znajomością narzędzi statystycznych i umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Moniki Żurek pt. „Interakcja genów jądrowych linii wsobnych kukurydzy (*Zea mays* L.) z cytoplazmami indukującymi męską sterylność” spełnia wymogi stawiane tego typu pracom, określone w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami DZ.U. z 2017 r. poz. 1789) uwzględniając rozporządzenie MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 roku w sprawie trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (DZ.U. z 2018 r. poz. 261). Jednocześnie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Moniki Żurek, ubiegającej się o stopień naukowy doktora, do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. inż. Renata Galek, prof. uczelni

