

Rzeszów, 2023-03-19

Prof. dr hab. inż. Mirosław Tyrka

Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki

E-mail: mtyrka@prz.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Walkowiak zatytułowanej „Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach form oleistych Inu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Roślin Oleistych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowego Instytutu Badawczego, Oddział w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. Stanisława Spasibionka. Praca została zaprezentowana w formie cyklu trzech spójnych tematycznie publikacji z opisem liczącym 56 stron. Badania zostały wykonane w ramach tematów statutowych realizowanych w latach 2017-2020. Opis cyklu publikacji zawiera niezbędne elementy formalne jak wykaz skrótów, spis treści oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wykorzystane w pracy trzy publikacje osiągnęły sumaryczną punktację MNiSW 190 punktów i łączny współczynnik wpływu ponad 6. W dwóch najważniejszych publikacjach opublikowanych w czasopiśmie Euphytica i Agronomy Doktorantka jest pierwszym i korespondencyjnym autorem.

We wstępie przedstawiono zagadnienia dotyczące pochodzenia i form użytkowych Inu. Omówiono znaczenie gospodarcze Inu oleistego, rejony jego uprawy oraz zróżnicowane możliwości jego wykorzystania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i chemicznym. Optymistyczny jest wzrost zainteresowania uprawą Inu w Polsce na przestrzeni lat 2013-2020. W dalszej części omawiany jest skład chemiczny nasion Inu, ich wysoka wartość energetyczna wynikająca z obecności tłuszczu, białka o dobrej strawności i błonnika pokarmowego. Podkreślono właściwości prozdrowotne związane z obecnością błonnika i lignanów.

Dużo uwagi poświęcono kwasom tłuszczowym podzielonym ze względu na liczbę i położenie podwójnych wiązań. Przedstawiono zróżnicowanie zawartości kwasów u różnych gatunków roślin oleistych i omówiono znaczenie dietetyczne poszczególnych grup kwasów tłuszczowych. Z jednej strony kwas α -linolenowy ma szereg zalet prozdrowotnych a z drugiej strony zbyt wysoki jego udział w stosunku do kwasów ω -6 przyczynia się do ograniczeń w trwałości i przydatności do spożycia. Na świecie uzyskano odmiany o zredukowanej zawartości kwasu α -linolenowego, które można

wykorzystać do wprowadzenia tej cechy do nowych odmian tolerancyjnych na stresy. Czy taka specjalizacja wykorzystania oleju do celów spożywczych nie przyczyni się do spadku przydatności w innych gałęziach przemysłu? Czy są jakieś dane o skali wykorzystania oleju lnianego z wysoką zawartością kwasu α -linolenowego w przemyśle chemicznym? W tym miejscu interesujące byłoby przedstawienie mechanizmów biochemicznych biosyntezy kwasów tłuszczowych z uwzględnieniem najważniejszych enzymów decydujących o powstawaniu omawianych w pracy kwasów tłuszczowych. Może udałoby się wtedy powiązać uzyskane w ramach pracy informacje o współdziałaniu genów ze szlakami biochemicznymi.

W dalszej części przedstawiono zagadnienia związane ze zmiennością genetyczną lnu i znaczenie kolekcji tego gatunku. Na uwagę zasługuje fakt, że w polskich ośrodkach zgromadzono pokaźną kolekcję 812 obiektów lnu oleistego, co stanowi bardzo dobry punkt wyjścia do charakterystyki markerami DNA, analiz asocjacyjnych oraz tradycyjnej hodowli. Kolejnym elementem kształtującym obecny stan zmienności genetycznej u lnu była mutagenеза. Metodą tą uzyskano cenne mutanty o silnie zredukowanej ilości kwasu α -linolenowego. W dalszej części przedstawiono metody biotechnologiczne stosowane do uzyskiwania zmienności genetycznej lnu oraz wykorzystanie markerów DNA do charakterystyki zmienności. Metodami inżynierii genetycznej zmieniano u lnu m.in. odporność na herbicydy i patogeny grzybowe, stres oksydacyjny, zawartość związków polifenolowych i wybranych kwasów tłuszczowych. Czy są jakieś doniesienia o stosowaniu do edycji genomu lnu metod bazujących na nukleazie Cas9?

W zakresie wykorzystania markerów molekularnych do charakterystyki lnu, Doktorantka wskazuje na nowoczesne możliwości badania uwarunkowań genetycznych różnych cech fenotypowych poprzez identyfikację sprzężeń markerów z cechami. W przypadku cech o złożonych uwarunkowaniach genetycznych schematy badawcze obejmują konstrukcję map genetycznych lub analizy asocjacyjne. Uzyskane markery mogą być wykorzystane do wspomagania hodowli lub w kompleksowych rozwiązaniach na bazie selekcji genomowej. Len był przedmiotem badań nad identyfikacją loci cech ilościowych takich jak masa tysiąca nasion, wysokość, czas dojrzewania, loci związanych z ilością i składem tłuszczów w nasionach, oraz odpornością na choroby grzybowe. Wymienione w przeglądzie metody analizy DNA obejmują również markery pozwalające na identyfikację polimorfizmu pojedynczych nukleotydów.

Podejmowane prace nad charakterystyką genetyczną są zbieżne z aktualnymi celami hodowlanymi lnu i obejmują dostosowanie cech jakościowych do potrzeb przemysłu poprzez poprawienie proporcji

kwasu linolowego do α -linolenowego jak 1:1 i 2:1. Ważne są również cele hodowlane bezpośrednio związane z plonowaniem jak tolerancja na stresy abiotyczne, szczególnie suszę i choroby grzybowe.

W dalszej części określono cel pracy i sprecyzowano 3 hipotezy badawcze dotyczące znaczenia kolekcji form wyjściowych Inu, znaczenia analizy sposobu dziedziczenia oraz roli metod analizy DNA w poprawie skuteczności selekcji. Sprecyzowano główny cel badań, którym jest uzyskanie materiałów wyjściowych do selekcji genotypów o pożądanym składzie kwasów tłuszczowych na drodze rekombinacji. Cele szczegółowe odpowiadały treści prac składających się na rozprawę.

W rozdziale materiał i metody skrótoowo przedstawiono materiał analizowany w kolejnych publikacjach oraz stosowane metody obejmujące charakterystykę fenologiczną, plon oraz cechy jakościowe. Interesująca jest metoda określania składu kwasów tłuszczowych na podstawie analizy połowy nasiona. W badaniach wykorzystano marker CAPS do zbadania zmienności w rejonie dwóch eksonów genu kodującego desaturazę kwasu tłuszczowego 3 (*LuFAD3*). Wyniki oceny fenotypowej prawidłowo opracowano przy wykorzystaniu narzędzi statystycznych z zakresu genetyki cech ilościowych.

W wyniku badań przeprowadzonych do pierwszej publikacji pt. „Ocena zmienności i współzależności cech użytkowych w kolekcji oleistych odmian i rodów Inu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)” uzyskano charakterystykę 31 obiektów kolekcyjnych o zróżnicowanym pochodzeniu pod względem 3 cech fenologicznych, plonu, masy tysiąca nasion (MTN), zawartości tłuszczu i jego składu. W wyniku analiz skupień wyodrębniono grupy jednorodne w tym grupę o obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego. Uzyskane dane są cenne z punktu widzenia charakterystyki materiałów kolekcyjnych i w przyszłości, po uzyskaniu danych dla większej liczby genotypów mogą być wykorzystane w badaniach asocjacyjnych.

W drugiej publikacji wykorzystano stosowane w hodowli heterozyjnej krzyżowania dialleliczne do oceny efektów ogólnej (GCA) i swoistej zdolności kombinacyjnej (SCA) 6 genotypów Inu o zróżnicowanym składzie kwasów tłuszczowych. Na podstawie wyników badań dwuletnich oceniono efekty GCA i SCA a następnie ustalono dominującą rolę addytywnego współdziałania genów w kształtowaniu zawartości kwasów linolowego i α -linolenowego. Zawartość kwasu oleinowego natomiast wynikała głównie z dominacji. W pracy posługiwano się sprawnie metodami z zakresu genetyki cech ilościowych i wybrano kombinacje krzyżówkowe, w których potomstwie można poszukiwać genotypów o docelowym stosunku kwasów ω -6 do ω -3. Uzyskane mieszańce pomiędzy komponentami o skrajnie różnych charakterystykach fenotypowych mogą służyć do wyprowadzenia populacji mapujących i lokalizacji loci cech ilościowych lub identyfikacji markerów związanych z niską

zawartością kwasu α -linolenowego w celu wprowadzenia tej cechy do wysokoplennych odmian Inu przy wspomaganii markerami.

W trzeciej publikacji zbadano zmienność fragmentu genu *LuFAD3A* w 6 odmianach Inu oleistego i włóknistego. Przeprowadzona analiza CAPS pozwoliła odróżnić odmianę Szafir od pozostałych badanych materiałów. Zmienność w wybranym rejonie nie była związana ze składem jakościowym tłuszczu. Należy wspomnieć, że metoda CAPS jest jedną z najprostszych metod identyfikacji mutacji punktowych, które ze względu na częstość występowania w genomach organizmów żywych obecnie należą do najważniejszych zmian. Wydaje się, że bardziej kompleksowe badania obejmujące sekwencjonowanie całych wybranych genów i rejonów promotorowych mogłyby dostarczyć danych niezbędnych do opracowania markera do selekcji i pozwoliły przewidzieć efekty na poziomie translacji.

W podsumowaniu zamieszczone zostały najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu trzech publikacji. Pozytywnie zweryfikowano hipotezę o znaczeniu i potrzebie charakterystyki kolekcji form wyjściowych Inu. Podobnie uzyskane oceny GCA i SCA stanowią dobry punkt wyjścia do wyboru kombinacji krzyżówkowej. U innych gatunków komponenty takie mogą być wybierane cyklicznie w procesie selekcji genomowej. Uwzględniając jednak niskie nakłady na badania Doktorantka dobrze sobie poradziła z tym zagadnieniem. Pomimo powszechnie panującego poglądu, że markery genetyczne są przydatne dla poprawy skuteczności selekcji pożądanych genotypów, przedstawione wyniki dotyczące zmienności w wybranym rejonie genu *LuFAD3A* zdają się nie potwierdzać tej hipotezy ponieważ opracowany marker nie był związany ze zmienionym składem kwasów tłuszczowych.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr inż. mgr inż. Magdaleny Walkowiak pt. „Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach form oleistych Inu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)” - zbiór 3 publikacji, spełnia kryteria określone w art. 13 ustawy z 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 trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie profesora (Dz.U. z 2018 r. poz. 261) zgodnie z art. 179 ustawy z 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Radzikowie o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Walkowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.