

Prof. dr hab. Alicja Pecio
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Z-d Żywienia Roślin i Nawożenia
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy

Puławy, 26.08.2019 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Wieremczuk pt.: " Analiza genetyczna i molekularna nowych genów niewrażliwości na fotoperiod (*Ppd*) w pszenżycie"

1. Ocena problematyki badawczej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Wieremczuk pt.: "Analiza genetyczna i molekularna nowych genów niewrażliwości na fotoperiod (*Ppd*) w pszenżycie" została wykonana w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Krzysztofa Kowalczyka i promotora pomocniczego dr Justyny Leśniowskiej-Nowak.

Produkcja zbóż należy do najważniejszych gałęzi ogólnej produkcji rolniczej. Wysiewane są na całym świecie w globalnej ilości ok. 2,6 mld ton. Pszenżyto jest najmłodszym zbożem na świecie. Jego łączna światowa produkcja wynosi około 17 milionów ton. Polska jest największym producentem pszenżyta na świecie. Rodzime uprawy tego zboża stanowią aż 1/3 upraw światowych i zajmują łącznie aż 1,33 mln ha. Jego produkcja w naszym kraju wynosi ponad 5 milionów ton ziarna rocznie, z czego na pszenżyto ozime przypada około 4,7 mln. Spośród wszystkich gatunków roślin zbożowych w Polsce zbiory pszenżyta stanowią 16,6 %, co plasuje ten gatunek na drugim miejscu zaraz po pszenicy. Jego znaczenie w Polsce zwiększa się z roku na rok. Duża popularność uprawy tego gatunku wynika z wysokiego poziomu plonowania, dużej przydatności paszowej, dobrej jakości i zdrowotności ziarna oraz możliwości uprawy na glebach słabszych, które w Polsce stanowią około 60%. Plony pszenżyta ozimego w doświadczeniach COBORU są bardzo wysokie, w warunkach uprawy intensywnej osiągają nawet 10 ton z hektara (2017 rok). Plony uzyskiwane w produkcji są niższe, stanowią 40% plonu potencjalnego i wynoszą ok. 4 tony ziarna z hektara (wg GUS 2017).

Obecnie bardzo aktualnym problemem w Polsce jest deficyt wody. Wynika on z ocieplenia się klimatu i wiąże się z występowaniem długoterminowych susz i wysokich temperatur. Jak twierdzą specjaliści, do połowy lat 90. XX wieku susze w Polsce

występowały zwykle co pięć lat, potem co dwa lata, a od kilku lat mamy permanentną suszę letnią. Na bardzo złą sytuację ogólną wpływają też beżśnieźne zimy oraz suche jesienie.

W kontekście tak złej sytuacji pogodowej, hodowla nowych odmian roślin odpornych na niedobory wody nabiera szczególnego znaczenia. Dlatego tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle aktualna, nie tylko w warunkach Polski, ale jest istotna także w świetle zachodzących obecnie światowych zmian klimatu.

Zgodnie z tym, co podaje Doktorantka, pszenżyto, pomimo zdolności adaptacyjnych, podobnie jak inne zboża, narażone jest na działanie stresu suszy, które skutkuje zmniejszeniem poziomu plonowania. Jedną ze strategii obronnych roślin przed jego negatywnymi skutkami jest modyfikacja cyklu rozwojowego. Dostosowanie terminu kwitnienia do warunków uprawy w danym regionie stwarza szansę na wyhodowanie nowych odmian, plonujących stabilnie w warunkach niekorzystnych. Wykazano, że geny niewrażliwości na fotoperiod przyspieszają termin kwitnienia, ale również wykazują efekty plejotropowe na komponenty plonu. Przeprowadzono wiele badań nad uwarunkowaniami genetycznymi oraz wpływem terminu kwitnienia na plonowanie pszenicy i jęczmienia. Pszenżyto nie jest jeszcze w tym względzie rozpoznane. Przedstawiona problematyka badawcza dobrze wpisuje się zatem w zapotrzebowanie praktyki rolniczej.

2. Formalna analiza pracy

Przedłożona do oceny praca obejmuje 120 stron maszynopisu, w tym 29 tabel, 33 ryciny i 4 fotografie, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz literatury, zawierający 200 pozycji piśmiennictwa krajowego i zagranicznego oraz wykaz oprogramowania bioinformatycznego, uwzględniający 4 pozycje.

Praca została napisana w zwyczajowo przyjętym układzie. Została podzielona na 9 rozdziałów, w których wydzielono liczne podrozdziały, wyszczególnione w spisie treści, co nadaje rozprawie dużą przejrzystość. Zasadniczą treść opracowania przedstawiono w następujących rozdziałach: „Przegląd literatury”, „Cel pracy”, „Materiał i metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Streszczenie” i „Literatura”. Układ pracy został opracowany w sposób logiczny, a praca odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim. W mojej ocenie brakuje jedynie rozdziału Wstęp, który zwykle krótko wprowadza czytelnika w problematykę podjętą w pracy, przedstawia hipotezę badawczą oraz cel badań.

Tytuł pracy jest czytelny, komunikatywny i adekwatny do treści dysertacji. Rozprawa jest zredagowana starannie, napisana poprawnym językiem, wskazuje na bardzo dobrą orientację Doktorantki w obszarze poruszanych zagadnień.

3. Merytoryczna analiza pracy

Rozprawę doktorską rozpoczyna rozdział „Przegląd literatury”, obejmujący 22 strony. Doktorantka porusza w nim kilka wątków tematycznych, z których pierwszy, dotyczący ogólnej charakterystyki pszenżyta, można uznać za wprowadzenie do problematyki badawczej. Opisuje on pochodzenie tego gatunku oraz cel jego stworzenia w wyniku krzyżowania międzyrodzajowego pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) i żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L). Doktorantka wylicza także liczne korzystne cechy pszenżyta, przejęte od form rodzicielskich, które decydują o jego konkurencyjności wśród innych zbóż pod względem zdolności adaptacyjnych do zróżnicowanych warunków glebowo-klimatycznych oraz jego liczne zastosowania: jako pasza dla zwierząt, w produkcji żywności, słodu, bioetanolu i biogazu, a także biodegradowalnych oraz jadalnych opakowań żywności, czy też żywności funkcjonalnej. Do „Wprowadzenia” zaliczyłabym również ciekawe dane statystyczne na temat udziału pszenżyta w strukturze zasiewów i wielkości produkcji.

Przegląd piśmiennictwa obejmuje także bardzo dobrze opisaną historię hodowli pszenżyta. Doktorantka wskazała, że pierwsze próby hodowli nowego gatunku podjęto już 1875 roku w Edynburgu. A przełomem było opracowanie technik ratowania zarodków oraz metody podwajania chromosomów z wykorzystaniem kolchicyny. Pierwszą odmianą, która cechowała się podwyższoną niewrażliwością na długość dnia była odmiana Armadillo. Powstała ona w wyniku badań nad pszenżytem w ramach programu, zainicjowanego przez dr. Normana Borlauga w Międzynarodowym Ośrodku Uszlachetniania Kukurydzy i Pszenicy (CIMMYT) w Meksyku w 1964 roku. Doktorantka bardzo słusznie i z dużą znajomością zagadnienia podkreśliła również udział polskiej hodowli pszenżyta, która pierwsze prace podjęła jeszcze w XIX wieku. Za prekursorów hodowli pszenżyta w Polsce uważani są prof. Czesław Tarkowski oraz prof. Tadeusz Wolski, którzy opracowali optymalny model odmiany konkurencyjnej w stosunku do pozostałych gatunków zbóż w średnich warunkach glebowo-klimatycznych.

W dalszej części rozdziału Doktorantka wymieniła kierunki hodowli twórczej pszenżyta, z których za najważniejsze uważa zwiększenie wielkości i wierności plonowania, poprawę wartości paszowej ziarna oraz jego właściwości wypiekowych, a także odporności na porastanie. Szczególną uwagę poświęciła potrzebie hodowli odmian odpornych na stesy biotyczne i abiotyczne oraz ich adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Wśród czynników ograniczających plonowanie, oprócz niskich temperatur, wymieniła niskie pH gleby oraz stres suszy, które są obecnie powszechnymi problemami zagrażającymi uprawom w Polsce. Zwróciła uwagę, że rośliny często potrafią radzić sobie z negatywnymi skutkami

suszy. Jednym z takich mechanizmów obronnych jest wcześniejsze kwitnienie, regulowane na poziomie genetycznym, w tym przez geny odpowiedzi na wernalizację (*Vrn*), geny wrażliwości na fotoperiod (*Ppd*) oraz geny wczesności *per se* (*EPs*). Autorka opisała wszystkie zależności, zwracając szczególną uwagę na geny niewrażliwości na fotoperiod.

Kolejnym zagadnieniem, które Doktorantka przybliżyła czytelnikowi, jest analiza polimorfizmu z wykorzystaniem systemów markerowych. Zwróciła tu uwagę na przewagę markerów molekularnych nad morfologicznymi oraz nad markerami białek strukturalnych i funkcjonalnych, ze względu na nieograniczoną liczbę, niezależność od fazy rozwojowej rośliny i wpływu środowiska, na wysoką powtarzalność i łatwość aplikacji, a także na wyższy poziom polimorfizmu, jaki określają. Doktorantka scharakteryzowała następnie wybrane, najczęściej stosowane w badaniach roślin systemy markerowe, zwracając uwagę na ich wady i zalety.

Rozdział jest napisany dobrze. Wprowadza czytelnika we wszystkie zagadnienia, związane z przedmiotem pracy. Doktorantka dokonała tu głębokiej analizy dostępnej wiedzy, powołując się na 152 pozycje literatury, głównie najnowszej, ale co należy podkreślić, dotarła także do pierwszych prac dotyczących opisywanej problematyki. Najstarsza pozycja pochodzi z 1876 roku. Wykazała przy tym dogłębną wiedzę oraz znajomość i umiejętność posługiwania się dostępną literaturą.

Niestety Doktorantka nie wykorzystwała przedstawionych rozważań do jednoznacznego sformułowania pytania, na które chciałaby w swojej pracy odpowiedzieć i dlaczego jest ono ważne. W tym celu należało krótko podsumować przedstawiony materiał i określić, co w świetle literatury pozostało do wyjaśnienia. W brakującym rozdziale „Wstęp” należało przedstawić hipotezę badawczą i dopiero na jej podstawie sformułować główny cel badań, uzupełniony o cele szczegółowe. Zostały one przedstawione w kolejnym rozdziale, zatytułowanym „Cel pracy”. Uwzględniają przede wszystkim identyfikację, charakterystykę i analizę molekularną genu niewrażliwości na fotoperiod w roślinach wyselekcjonowanych z populacji mieszańcowej Clever x Amilo x *Dasypyrum villosum*) x Nadobna, określenie sposobu jego dziedziczenia, szacunek jego wpływu na wybrane cechy ilościowe pszenżyta oraz określenie korelacji pomiędzy terminem kwitnienia i analizowanymi cechami ilościowymi, a także porównanie sekwencji zidentyfikowanego genu z sekwencjami zdeponowanymi w bazie GenBank na platformie NCBI oraz identyfikacja markerów DArT sprzężonych z tym genem.

Material i metody

Opracowanie poprawnej metodyki stanowi podstawę rzetelności prowadzonych badań i decyduje o ich przebiegu, wynikach i wnioskach końcowych. W przypadku recenzowanej pracy metodyka obejmowała wykonanie krzyżowań, prowadzenie doświadczeń polowych, fenotypowanie roślin, oznaczenia laboratoryjne i analizy statystyczne. Do krzyżowań wykonanych w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie Doktorantka wykorzystała pszenicę zwyczajną odmiany Clever oraz mieszańca żyta odmiany Amilo z *Dasypyrum villosum* (L) Borbás. Uzyskane mieszańce krzyżowała wstecznie z pszenicą ozimą odmiany Nadobna. Uzyskane w efekcie rośliny mieszańcowe poddała ocenie fenotypowej pod względem terminu kwitnienia. Na tej podstawie wyselekcjonowała formy wczesne i późne, które następnie przekrzyżowała, a uzyskanego mieszańca oznaczyła jako P1xW3. W kolejnych latach, z ziarna izolowanych kłosów, pozyskała rośliny, z których populacje segregujące pokoleń F₂ i F₃ posłużyły do identyfikacji genu niewrażliwości na fotoperiod, określenia jego wpływu na elementy plonowania oraz do identyfikacji markerów sprzężonych z analizowaną cechą. Przedmiotem analiz były również: a) komponenty rodzicielskie analizowanych populacji, czyli wyselekcjonowane rośliny wczesne i późne oraz inne komponenty wchodzące w skład ostatecznej krzyżówki, b) odmiany pszenicy zwyczajnej posiadające zidentyfikowane geny odpowiedzi na fotoperiod *Ppd* oraz c) linie izogeniczne, odmiany i komponenty rodzicielskie, wykorzystane do analizy sekwencji genów. W celu poprawy przejrzystości opisu, proponuję uwzględnić w tabeli 1 wszystkie wymienione materiały, z podziałem na grupy uwzględnione w tekście.

Wszystkie wymienione elementy materiału badawczego Doktorantka testowała w doświadczeniach polowych, prowadzonych na poletkach Gospodarstwa Doświadczalnego Felin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Na podstawie terminu kwitnienia roślin pokolenia F₃ wyselekcjonowała formy homozygotyczne, które nie rozszczepiały się pod względem tej cechy. Pomiarom biometrycznym poddała 179 roślin wczesnych i późnych pokolenia F₂, 694 rośliny pokolenia F₃ oraz po 10 roślin rodzicielskich P i W (późny i wczesny). Określała cechy ilościowe pędu głównego: długość pędu, liczbę kłosków w kłosie, zbitość kłosa, liczbę i masę ziarniaków w kłosie, płodność kłoska oraz masę 1000 ziarniaków.

Niestety opisy zabiegów doświadczalnych i analiz w kolejnych latach wydają się niezupełnie zgodne w poszczególnych podrozdziałach rozdziału „Material i metody”. Warto byłoby je ujednolicić, przedstawiając cały przebieg badań schematycznie na jednym wykresie.

W rozdziale tym Doktorantka określiła również, w tabeli 2 i tabeli 3, przebieg warunków pogody w Stacji Doświadczalnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Felinie w latach prowadzenia badań. Wyszczególniła tu średnią temperaturę i sumę opadów w okresie od maja do czerwca w latach 2014 i 2015. W tekście jednak brakuje interpretacji przedstawionych danych. Brakuje również tych samych danych w okresie od siewu do maja każdego roku, przy czym dat siewu Autorka także nie podała. Proszę o wyjaśnienie, czym Doktorantka kierowała się nie prezentując tych danych.

Uzyskane wyniki badań Doktorantka poddała analizie statystycznej z zastosowaniem polskiej wersji programu statystycznego Statistica 13.3. Wykonała analizę genetyczną z wykorzystaniem testu χ^2 , analizę normalności rozkładu badanych cech z wykorzystaniem testu Shapiro-Wilka oraz analizę korelacji pomiędzy terminem kwitnienia a badanymi cechami ilościowymi w populacjach pokolenia F_2 i F_3 , z wykorzystaniem współczynnika korelacji rang Spearmana. Do porównania form rodzicielskich, form wczesnych i form późnych w zakresie cech ilościowych, których rozkład nie był zgodny z rozkładem normalnym, zastosowała test nieparametryczny, tj. jednoczynnikową analizę wariancji dla rang Kruskala-Walisa, tzw. ANOVA Kruskala-Wallisa. Do porównań w zakresie cech o rozkładzie normalnym wykorzystowała test parametryczny – jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. Doktorantka szczegółowo opisała podstawy teoretyczne zastosowanych metod, co świadczy o jej dobrym przygotowaniu i uzasadnionym wyborze właściwych metod.

Kolejnym etapem pracy były analizy molekularne, w tym analiza sekwencji genów *Ppd* oraz identyfikacja markerów DNA sprzężonych z genem niewrażliwości na fotoperiod z wykorzystaniem technologii DArT.

Reasumując można stwierdzić, że przedstawiona metodyka badań zapewniła pełną realizację zamierzonych zadań, jest kompleksowa, a poszczególne etapy zaplanowane i opisane w oparciu o dogłębną wiedzę Doktorantki.

Wyniki

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań zostały przedstawione na 43 stronach maszynopisu. Ich opis Doktorantka podzieliła na podrozdziały odpowiadające kolejnym celom pracy.

W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka wykazała, że gen niewrażliwości na fotoperiod zidentyfikowany w roślinach z populacji mieszańcowej *Clever* x (*Amilo* x *Dasypyrum villosum*) x *Nadobna* jest nie w pełni dominujący i przyspiesza termin kwitnienia średnio o 5-10 dni. Na podstawie analiz molekularnych oraz porównania sekwencji

dostępnych w bankach genów wykazała, że gen determinujący niewrażliwość na długość dnia znajduje się w locus *Ppd-B1* i jest nowym allelem tego genu. Zidentyfikowany gen niewrażliwości na fotoperiod nie wykazywał silnych efektów plejotropowych na wysokość roślin, chociaż rośliny wczesne charakteryzowały się istotnie dłuższym pędem głównym niż rośliny późne. Formy wczesne posiadały również dłuższą osadkę kłosową, większą liczbę płodnych kłosek i masę tysiąca ziarniaków niż formy późne. Charakteryzowały się też mniejszą liczbą kłosek w kłosie oraz liczbą i masą ziarniaków w kłosie głównym w porównaniu do form rodzicielskich.

Doktorantka stwierdziła ujemną korelację pomiędzy terminem kwitnienia a parametrami pędu głównego, tj. jego długość, długość osadki kłosowej, liczba kłosek w kłosie, liczba i masa ziarniaków w kłosie, płodność kłoska oraz masa 1000 ziarniaków. Dodatnią korelację wykazała dla zbitości kłosa.

Zidentyfikowane różnice pomiędzy sekwencjami badanej populacji o kombinacji krzyżówkowej Clever x (*Amilo* x *Dasypyrum villosum*) x Nadobna z form wczesnych i późnych były mutacjami punktowymi typu Indel oraz transwersją lub tranzycją.

Przeprowadzone badania molekularne umożliwiły wybór 7 sekwencji markerów DArT specyficznych dla genotypów o wczesnym terminie kwitnienia.

Wyniki ocenianej rozprawy mgr inż. Aleksandry Wieremczuk są bardzo wartościowe i wydatnie poszerzają wiedzę na temat hodowli pszenżyta z wykorzystaniem genów niewrażliwości na fotoperiod. Zostały opisane dobrze, w sposób niebudzący zastrzeżeń.

Dyskusja

W rozdziale „Dyskusja”, który liczy 10 stron, Autorka konfrontuje wyniki badań własnych z literaturą przedmiotu, w ciekawy i przekonujący sposób przytacza argumenty z rozprawy doktorskiej, potwierdzając je lub polemizując z rezultatami badań innych autorów. Rozdział ten zredagowała w oparciu o 58 (29%) pozycji literatury przedmiotu. Wykorzystała głównie literaturę najnowszą, ale dotarła także do prac wcześniejszych. Najstarsza pozycja cytowana w tym rozdziale pochodzi z 1973 roku.

Wnioski

Zakończenie części merytorycznej pracy doktorskiej stanowi rozdział „Wnioski”, będący odpowiedzią na postawione wcześniej cele badawcze. Doktorantka sformułowała je poprawnie w 9 punktach, które jednak stanowią raczej podsumowanie kolejnych etapów pracy. Dlatego proponuję, aby rozdziałowi temu nadać tytuł „Podsumowanie i wnioski”.

Literatura

W rozdziale tym Doktorantka zamieściła 200 pozycji literatury oraz 4 programy bioinformatyczne. Wśród zamieszczonych prac 78% stanowią prace opublikowane w języku obcym, głównie angielskim.

Sporządzając spis literatury Doktorantka nie uniknęła pewnych błędów redakcyjnych: w pozycji 56 pominęła rok publikacji, pozycje 58 i 59 ułożyła w niewłaściwej kolejności, w pozycji 69 należy sprawdzić rok wydania, gdyż cytowanie w tekście zaopatrzone jest w inny, pozycja 77 zawiera błąd literowy w nazwisku pierwszego autora, pozycja 100 nie została wykorzystana w tekście, a cytowana pozycja „Roche 2010” nie została tu uwzględniona. Pozycje 184-188 należy posegregować według nazwiska drugiego autora zamiast roku wydania.

4. Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera bogaty i oryginalny materiał dokumentacyjny oraz stanowi wartościową, a zarazem nowatorską pozycję naukową w zakresie genetyki i hodowli nowych odmian pszenżyta ozimego.

Doktorantka wykazała dobrą znajomość literatury przedmiotu i umiejętność jej wykorzystania w badaniach własnych. Zostały one zaplanowane prawidłowo i były konsekwentnie realizowane. Uzyskane wyniki pozwoliły osiągnąć założone cele badań. Układ pracy, założenia metodyczne, analiza wyników badań i ich konfrontacja z literaturą utwierdzają w przekonaniu, że Doktorantka jest dobrze przygotowana do prowadzenia pracy naukowej oraz potrafi korzystać z metod statystycznych i prawidłowo interpretować uzyskane wyniki badań.

Pragnę podkreślić, że wykazane w recenzji uchybienia pracy i niedociągnięcia w żadnej mierze nie zmniejszają wartości naukowej i poznawczej rozprawy doktorskiej, a mają jedynie charakter redakcyjny. Rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Wieremczuk niewątpliwie wnosi trwały ślad w wiedzę z zakresu dziedziny nauk rolniczych, w dyscyplinie agronomia, genetyka i hodowla roślin.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Wieremczuk pt.: "Analiza genetyczna i molekularna nowych genów niewrażliwości na fotoperiod (*Ppd*) w pszenżycie" spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U z 2016 r. poz. 882 ze zm.). Składam zatem wniosek do Rady Wydziału Agrobiotechnologii Uniwersytetu

Przyrodniczego w Lublinie o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Wieremczuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ogrom pracy włożonej w przeprowadzenie badań, ich dogłębność i kompleksowość, oraz aktualność i znajomość problematyki badawczej skłaniają mnie do zaproponowania Radzie Wydziału wyróżnienia Panią mgr inż. Aleksandry Wieremczuk stosowną nagrodą.

Puławy, 26.08.2019 r



Alicja Pecio