

Rzeszów, 2024-03-20

Prof. dr hab. inż. Mirosław Tyrka
Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki
Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza
E-mail: mtyrka@prz.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Anety Koroluk zatytułowanej „Charakterystyka puli genowej polskich odmian i linii hodowlanych owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) oraz ocena możliwości jej poszerzenia poprzez krzyżowanie międzygatunkowe”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Instytucie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Agrobiotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Edyty Paczos-Grzędy, prof. uczelni oraz promotora pomocniczego dr Sylwii Sowcy. Praca doktorska stanowi zbiór trzech spójnych tematycznie publikacji z dodatkowym opisem obejmującym m.in. wprowadzenie, omówienie najważniejszych wyników z elementami dyskusji oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Przedstawione w pracy doktorskiej wyniki zostały sfinansowane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej realizowanych w latach 2014-2020.

Wykorzystane w pracy doktorskiej trzy publikacje w czasopismach *Agronomy* (IF₂₀₂₂=5.2), *International Journal of Molecular Sciences* (IF₂₀₂₃=8.1) i *Agriculture* (IF₂₀₂₂=3.6) osiągnęły sumarycznie 340 punktów MNiSW a zgodnie z danymi w bazie SCOPUS łączny współczynnik wpływu wynosi 16.9. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem a Jej wkład był znaczący (50-60%) i polegał na opracowaniu lub współtworzeniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu statystycznym wyników oraz zaangażowaniu w napisanie publikacji. W wybranych pracach mgr inż. Anna Koroluk sformułowała hipotezę badawczą, przygotowała DNA, wykonywała analizy polowe lub laboratoryjne. Dołączone do rozprawy oświadczenia potwierdzają udziały poszczególnych współautorów w wykorzystanych publikacjach.

Wprowadzenie zawiera informacje na temat systematyki rodzaju *Avena* z uwzględnieniem roli głównych mechanizmów ewolucyjnych, zróżnicowania genomowego i udomowienia. W dalszej części omówiono zalety składu chemicznego ziarniaków owsa i znaczenie prozdrowotne wybranych



elementów. Pomimo korzystnych wartości żywieniowych, znaczenia fitosanitarnego i niskich wymogów glebowych owies wydaje się być rośliną niedocenioną, co przekłada się na względnie niewielką powierzchnię upraw. Zastanawiająca jest przyczyna tego, że średnie plony z hektara w Polsce są około połowę niższe niż średnie plony w krajach z początku listy rankingowej?

W dalszej części omówiono historię hodowli owsa w Polsce prowadzącą do zawężenia puli genowej we współczesnych odmianach. Odmiany historyczne nie były zbyt często wykorzystywane w bieżących programach hodowlanych, dlatego krzyżowania oddalone stanowią alternatywne źródło ważnych ekonomicznie genów. Dostępność genów jest związana głównie z poziomem ploidalności i zgodnością składu genomowego gatunków spokrewnionych z genomem owsa zwyczajnego (AACDD) oraz z występowaniem mutacji strukturalnych, które przyczyniają się do supresji crossing-over.

Przedstawiono charakterystykę owsa głuchego jako trudnego do zwalczania chwastu, który jest jednak zachowywany i wykorzystywany jako źródło użytecznych genów związanych m.in. z cechami morfologicznymi, fizjologicznymi, kształtującymi jakość plonu oraz warunkującymi tolerancję na stresy biotyczne i abiotyczne. Wymieniono szczególnie udane przykłady wykorzystania *Avena fatua* jako dawcy genu karłowatości *Dw8*, genów wczesności i poprawy wartości odżywczych ziarna. Ważnym kierunkiem wykorzystania owsa głuchego jest hodowla odpornościowa i w tym zakresie zespoły Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie kierowane przez pracowników Instytutu Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin mają w mojej ocenie silną pozycję międzynarodową.

W dalszej części przedstawiono badania zmienności genetycznej przy wykorzystaniu różnych systemów markerowych. Początkowo charakterystyka genetyczna była stosowana do niewielkiej liczby genotypów z wykorzystaniem markerów losowych lub częściowo losowych, przechodząc przez techniki AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*) a kończąc na sekwencjonowaniu nowej generacji, które pozwala na masowe wykrywanie tysięcy markerów w populacjach segregujących, lub reprezentujących zmienność wewnątrzgatunkową. Wstęp został napisany bardzo syntetycznie i jest ściśle związany z tematem pracy.

W drugim rozdziale przedstawiono siedem hipotez. Merytorycznie wszystkie postawione hipotezy są uzasadnione. Jeśli chodzi o hipotezę nr 4, która zakłada niską korelację pomiędzy wartościami podobieństwa genetycznego dla markerów z danymi o pochodzeniu, to wydaje się, że wartości te powinny być statystycznie istotnie skorelowane, ponieważ w analizach asocjacyjnych lub selekcji genomowej często dane markerowe są wykorzystywane jako substytut danych o pochodzeniu. Przepuszczalnie zawężenie tej hipotezy do wybranych systemów markerowych byłoby celowe ponieważ można się spodziewać że systemy bazujące na markerach „prążkowych” mogą być mniej specyficzne niż markery bazujące na polimorfizmach pojedynczych nukleotydów. Wydaje się, że

obecność 3 genomów homeologicznych u owsa może zniekształcać ocenę bazującą na klasycznych markerach PCR. W celu weryfikacji hipotez nakreślono siedem celów badawczych, które pokrywają zakres poruszanych zagadnień.

Materiał badawczy wykorzystany w pracy doktorskiej stanowiły trzy grupy owsa zwyczajnego odpowiadające poszczególnym publikacjom tj. 72 historyczne i nowsze odmiany polskie, 487 odmian i linii hodowlanych oraz dwie populacje F_2 uzyskane z krzyżowań międzygatunkowych z *A. fatua*. Metody analizy rodowodów odmian, izolacji DNA do analiz PCR i analiz DArTseq oraz genotypowania z wykorzystaniem systemów ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*) i REMAP (ang. *retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism*) zostały przedstawione wystarczająco szczegółowo. Uzyskane segregacje markerów wykorzystano m.in. do obliczeń parametrów opisujących wartość markera, określania związku z rodowodami, analizy głównych składowych i struktury populacji. Wykorzystano różnorodne narzędzia statystyczne w celu kompleksowego opracowania danych.

Ciekawym uzupełnieniem metodyki zawartej w pracach jest opis uzyskiwania populacji segregujących *A. fatua* × *A. sativa* oraz *A. sativa* × *A. fatua*. Niekiedy przy opisie warunków doświadczalnych podawany jest przebieg warunków pogodowych, głównie w celu ustalenia czy w trakcie wegetacji miały miejsce czynniki przyczyniające się powstawania warunków stresowych. Badania obejmowały ocenę dwóch cech związanych z przebiegiem wegetacji oraz dziewięciu cech plonotwórczych. Uzyskane dane wykorzystano do obliczenia płodności kłoska, masy tysiąca ziaren i współczynnika wylegania. Cechy fenotypowe przeanalizowano statystycznie pod względem dopasowania rozkładu do normalnego, jednorodności wariancji i różnych testów istotności statystycznej

W wyniku badań zaprezentowanych w pierwszej publikacji scharakteryzowano 72 polskie odmiany owsa zwyczajnego z okresu 1893 – 2008 pod względem zmienności markerów ISSR i REMAP w grupach zależnych od roku dopuszczenia do uprawy oraz ośrodków hodowli. Przeprowadzono bardzo wnikliwą analizę rodowodów badanych odmian owsa cofając się wstecz do odmian miejscowych. Przedstawione dane zostały zakorzenione w przekształceniach spółek hodowlanych i dają obraz powiązań z hodowlą niemiecką sugerując stosunkowo wąską pulę genetyczną wykorzystaną do selekcji obecnie zarejestrowanych odmian. Zmiany puli genetycznej w latach i ośrodkach hodowli oceniono na podstawie 203 markerów ISSR. Przeprowadzono analizę skupień i struktury populacji identyfikując okresy rejestracji i ośrodki hodowlane z grupami odmian o najwyższej oczekiwanej heterozygotyczności. Analizy statystyczne wykazały, że zmienność analizowanych odmian owsa zwyczajnego głównie występowała w obrębie wydzielonych grup. Odmiany tworzyły 3 główne skupienia zgodne w 58% z danymi o pochodzeniu.

Nieco inne wyniki analizy statystycznej uzyskano na podstawie zmienności 155 polimorficznych markerów REMAP. Podobnie jak dla danych z ISSR większość zmienności lokowała się w obrębie grup wyznaczonych na podstawie lat i ośrodków hodowli. Przydział materiałów do subpopulacji na podstawie obu systemów markerowych cechował się wysoką (80%) zgodnością. Nie uzyskano jednak istotnych korelacji macierzy zróżnicowania genetycznego z rodowodami, a największą zmienność zidentyfikowano w grupie najnowszych odmian.

W drugiej publikacji przedstawiono wyniki kompleksowej analizy 487 odmian i zaawansowanych linii hodowlanych owsa w oparciu o 7411 markerów SNP. Doktorantka wskazała na konieczność filtrowania markerów w celu wyeliminowania tych pochodzących równocześnie z kilku genomów homeologicznych owsa. Można przypuszczać, że właśnie podobieństwo genomów mogło stanowić główną przyczynę nieistotnej korelacji markerów ISSR i REMAP z danymi o rodowodzie. Brak danych o sekwencji tych markerów i ograniczone możliwości ich zmapowania na genomie owsa były przyczyną wykorzystania wszystkich markerów w analizie, podczas gdy jedynie około 23% markerów SNP uznano za przydatne ze względu na unikalną lokalizację. Zbadano również rozkład występowania markerów na poszczególnych genomach i chromosomach z uwzględnieniem heterozygotyczności. Analizy wskazują na odrębność niektórych linii STH i większości odmian zagranicznych reprezentujących pozaeuropejskie programy hodowlane od pozostałych badanych odmian i materiałów hodowlanych. Wydzielone grupy odmian charakteryzowano dalej w celu identyfikacji odrębnych puli genowych wykorzystywanych w różnym stopniu przez firmy hodowlane.

Wykonano również analizę występowania alleli unikalnych w materiałach z różnych ośrodków hodowlanych i odmianach zagranicznych. Nie stwierdzono wyraźnego zubożenia w obrębie polskiej puli genowej rodzimego owsa, dzięki wykorzystywaniu w programach odmian zagranicznych. Szczególną rolę w kształtowaniu obecnego stanu zmienności genetycznej miało wprowadzenie do krzyżowań mutantu odmiany 'Swan' wnoszącego 142 unikalne allele. Część z tych alleli zlokalizowanych na chromosomie 4D może być odpowiedzialna za plon ziarna oraz szereg ważnych cech plonotwórczych i fenologicznych.

Dostępność materiałów o dużym zróżnicowaniu genetycznym wykorzystano do analiz rejonów genomu, które ulegały selekcji. Szczególne znaczenie miał chromosom 6A, na którym zlokalizowano wiele loci warunkujących cechy jakościowe ziarna owsa. Zidentyfikowano również inne chromosomy, które ulegały lub nie presji selekcyjnej. Podkreślono przepływ genów z genomu C do A i D owsa oraz wyodrębniono kolekcję bazową liczącą 289 odmian. Analizy potwierdziły duży wkład hodowców w utrzymanie zmienności puli genowej przy równoczesnym zwiększeniu potencjału plonowania nowych polskich odmian owsa.

W trzeciej pracy do poszerzenia zmienności genetycznej wykorzystano krzyżowania z *Avena fatua*. Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin UP w Lublinie ma bogate tradycje w wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w hodowli zbóż i wiele cennych materiałów owsa z korzystnymi cechami przekazano do hodowli.

W ramach przeprowadzonych badań scharakteryzowano formy rodzicielskie i dwie liczące ponad 150 roślin populacje F_2 uzyskane z krzyżowań dwukierunkowych *A. fatua* '51532' i *A. sativa* 'Sam'. Mieszańce *A. sativa* x *A. fatua* cechowały się zredukowanym wzrostem w stosunku do rodziców i populacji *A. fatua* x *A. sativa*. W pokoleniach mieszańców stwierdzono transgresję pod względem grubości drugiego od dołu międzywęźla, długości dokłosa, długości wiech i daty wiechowania oraz znaczną zmienność pod względem krzewienia i liczby międzywęźli. W obu populacjach F_2 występowały również formy przewyższające rodziców pod względem średniej liczby kłosek w wieszce, płodności kłosa i masy tysiąca ziaren, co przekładało się na wzrost liczby i masy ziarniaków z wiechy głównej. Wśród roślin segregujących identyfikowano genotypy wartościowe dla hodowców. Wpływ cytoplazmy był widoczny dla długości dokłosa. Populacje segregowały pod względem osypywania ziaren i kłosek. Publikacja zawiera kompleksową i pracochłonną charakterystykę materiałów. Stwierdzona wysoka zmienność fenotypowa uzasadnia wykonanie analiz genetycznych w późniejszych pokoleniach w celu identyfikacji loci cech ilościowych.

Opis wyników kończy 13 wniosków i stwierdzeń. Pierwsze pięć wniosków stanowi podsumowanie wyników uzyskanych w pierwszej pracy. Wnioski nr 7 i 8 podsumowują korelacje podobieństw genetycznych z rodowodami. W przypadku wniosku nr 7 za przyczynę niskiej korelacji uznano wadliwość analizy rodowodowej w przypadku badania odmian owsa wywodzących się spośród niewielkiej liczby spokrewnionych przodków. Lepszym wyjaśnieniem wydaje się niedoskonałość markerów uzyskanych metodami ISSR i REMAP. Wnioski nr 6, 9 i 10 dotyczą kompleksowej analizy materiałów hodowlanych przy wykorzystaniu wydajnych systemów markerowych z uwzględnieniem zmian na poziomie subgenomów i chromosomów. Wnioski 11-13 odnoszą się do najciekawszych wyników opisanych w trzeciej publikacji dotyczących transgresji większości badanych cech fenotypowych, dziedziczenia długości dokłosa po linii matecznej i jednogennego dziedziczenia osypywania ziarniaków w krzyżowaniach z *A. fatua*.

Praca doktorska mgr inż. Anety Koroluk została opracowana starannie, zawiera ciekawe wyniki stanowiące dokładną charakterystykę procesów prowadzących do obecnego stanu hodowli owsa zwyczajnego w Polsce. Uzyskane dane są w mojej ocenie niezwykle cenne i perspektywiczne. Charakterystyka genetyczna panelu genotypów przedstawiona w pracy nr 2 po połączeniu z wielorodowiskowymi danymi fenotypowymi może służyć do identyfikacji markerów zasocjowanych z

cechami i genów kandydujących, przyczyniając się do lepszego zrozumienia mechanizmów stojących u podstaw poprawy plonowania owsa zwyczajnego. Wyniki zostały uzyskane przy wykorzystaniu najnowszych narzędzi badawczych a dorobek naukowy mgr inż. Anety Koroluk obejmuje 12 publikacji o sumarycznym IF 40.6 i 930 pkt MEiN, 10 innych publikacji, 21 prac w materiałach konferencyjnych i współautorstwo 8 patentów. Doktorantka brała udział w siedmiu projektach dotyczących zbóż finansowanych z postępu biologicznego.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca „Charakterystyka puli genowej polskich odmian i linii hodowlanych owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) oraz ocena możliwości jej poszerzenia poprzez krzyżowanie międzygatunkowe” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). W związku z powyższym wnioskuję do Rady Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie mgr inż. Anety Koroluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uwzględniając kompleksowość i jakość opracowania danych oraz dotychczasowy dorobek wnoszę o wyróżnienie pracy.